

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008929601

WPI Acc No: 1992-056870/\*199207\*

Related WPI Acc No: 1992-025485

XRAM Acc No: C92-025709

O-glycosylated alpha interferon - used for treatment of viral and tumour diseases

Patent Assignee: BOEHRINGER INGELHEIM INT GMBH (BOEH )

Inventor: ADOLF G; AHORN H J; HIMMLER A; KALSNER I; MAURER-FOGY I; AHORN H; MAURERFOGY I

Number of Countries: 026 Number of Patents: 014

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 9201055	A	19920123				199207	B
AU 9182082	A	19920204	AU 9182082	A	19910706	199220	
			WO 91EP1266	A	19910706		
DE 4035877	A	19920514	DE 4035877	A	19901112	199221	
FI 9300058	A	19930108	WO 91EP1266	A	19910706	199314	
			FI 9358	A	19930108		
EP 538300	A1	19930428	EP 91912306	A	19910706	199317	
			WO 91EP1266	A	19910706		
NO 9300059	A	19930108	WO 91EP1266	A	19910706	199317	
			NO 9359	A	19930108		
CS 9203863	A2	19930811	CS 923863	A	19921223	199344	
EP 538300	B1	19940413	EP 91912306	A	19910706	199415	
			WO 91EP1266	A	19910706		
JP 6502987	W	19940407	JP 91511638	A	19910706	199419	
			WO 91EP1266	A	19910706		
DE 59101397	G	19940519	DE 501397	A	19910706	199421	
			EP 91912306	A	19910706		
			WO 91EP1266	A	19910706		
AU 650893	B	19940707	AU 9182082	A	19910706	199431	
HU 65846	T	19940728	WO 91EP1266	A	19910706	199431	
			HU 9336	A	19910706		
SK 9203863	A3	19940810	SK 923863	A	19921223	199436	
			WO 91EP1266	A	19910000		
ES 2063515	T3	19950101	EP 91912306	A	19910706	199508	

Priority Applications (No Type Date): DE 4035877 A 19901112; DE 4021917 A 19900710

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; DE 3306060; EP 158420; US 4289690; WO 8300693

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9201055 A

Designated States (National): AU CA CS FI HU JP KR NO PL SU US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE

AU 9182082 A C12N-015/21 Based on patent WO 9201055

DE 4035877 A 19 C07K-015/26

EP 538300 A1 G C12N-015/21 Based on patent WO 9201055

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

EP 538300 B1 G 58 C12N-015/21 Based on patent WO 9201055

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

JP 6502987 W 23 C12N-015/21 Based on patent WO 9201055

BEST AVAILABLE COPY

DE 59101397	G	C12N-015/21	Based on patent EP 538300
			Based on patent WO 9201055
AU 650893	B	C07K-013/00	Previous Publ. patent AU 9182082
			Based on patent WO 9201055
HU 65846	T	C12N-015/21	Based on patent WO 9201055
ES 2063515	T3	C12N-015/21	Based on patent EP 538300
FI 9300058	A	C12N-000/00	
NO 9300059	A	C12N-015/21	
CS 9203863	A2	C12N-015/21	
SK 9203863	A3	C12N-015/21	

Abstract (Basic): WO 9201055 A

Alpha-interferon (IFNalpha) which is O-glycosylated and has the biological and/or immunological properties of IFN alpha(2) is new. Specified are O-glycosylated IFNalpha-2a, -2b and -2c.

More specifically, the prod. is glycosylated at Thr-106, esp. by Gal-GalNAc (including its mono- or di-silylated derivs.) or Gal-(Gal-GlcNAc)-GalNAc.

USE - The glycosylated IFN's are used (partic. as a mixt. of at least 2 of the alpha-2a, -2b or -2c forms) for treatment of viral and tumour diseases.

Dwg.0/24

Title Terms: GLYCOSYLATED; ALPHA; INTERFERON; TREAT; VIRUS; TUMOUR; DISEASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00; C07K-015/26; C12N-015/21

International Patent Class (Additional): A61K-037/66; C12P-021/02;

C12P-021/08

File Segment: CPI

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : <b>C12N 15/21, C12P 21/02, 21/08 A61K 37/66</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 92/01055</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>23. Januar 1992 (23.01.92)</b></p>																																																																																								
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP91/01266</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>6. Juli 1991 (06.07.91)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten:  <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 40 21 917.8</div> <div>10. Juli 1990 (10.07.90)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 40 35 877.1</div> <div>12. November 1990 (12.11.90)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : <b>ADOLF, Günther [AT/AT]; Stiflgasse 15-17/10, A-1070 Wien (AT). HIMMLER, Adolf [AT/AT]; Fürst Liechtensteinstr. 2/3, A-1236 Wien (AT). AHORN, Horst, Johann [AT/AT]; Eisenstädterstr. 3/1, A-2484 Weigelsdorf (AT). KALSNER, Inge [AT/AT]; Geusaugasse 51/20, A-1030 Wien (AT). MAURER-FOGY, Ingrid [AT/AT]; Lindauergasse 35, A-1238 Wien (AT).</b></p>	<p>(74) Gemeinsamer Vertreter: <b>BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; A Patente, Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE).</b></p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), CS, DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KR, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, PL, + SE (europäisches Patent), SU, US.</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.  Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>																																																																																									
<p>(54) Title: <b>O-GLYCOSYLATED IFN-ALPHA</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b>O-GLYCOSYLIERTES IFN-ALPHA</b></p> <p>(57) Abstract</p> <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>The objects of the invention are O-glycosylated IFN-alpha, a process for producing the same and the use of the O-glycosylated proteins as medicinal drugs.</p> </div> <div style="flex: 2;"> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">10</td> <td style="text-align: center;">15</td> </tr> <tr> <td colspan="4">CYS-ASP-LEU-PRO-GLN-THR-HIS-SER-LEU-GLY-SER-ARG-ARG-THR-LEU-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">25</td> <td style="text-align: center;">30</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">MET-LEU-LEU-ALA-GLN-MET-ARG-ARG-ILE-SER-LEU-PHE-SER-CYS-LEU-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">35</td> <td style="text-align: center;">40</td> <td style="text-align: center;">45</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">LYS-ASP-ARG-ARG-ASP-PHE-GLY-PHE-PRO-GLN-GLU-GLU-PHE-GLY-ASN-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">50</td> <td style="text-align: center;">55</td> <td style="text-align: center;">60</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">GLN-PHE-GLN-LYS-ALA-GLU-THR-ILE-PRO-VAL-LEU-HIS-GLU-MET-ILE-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">65</td> <td style="text-align: center;">70</td> <td style="text-align: center;">75</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">GLN-GLN-ILE-PHE-ASN-LEU-PHE-SER-THR-LYS-ASP-SER-SER-ALA-ALA-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">80</td> <td style="text-align: center;">85</td> <td style="text-align: center;">90</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">TRP-ASP-GLU-THR-LEU-LEU-ASP-LYS-PHE-TYR-THR-GLU-LEU-TYR-GLN-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">95</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">105</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">GLN-LEU-ASN-ASP-LEU-GLU-ALA-CYS-VAL-ILE-GLN-GLY-VAL-GLY-VAL-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">110</td> <td style="text-align: center;">115</td> <td style="text-align: center;">120</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">THR-GLU-THR-PRO-LEU-MET-LYS-GLU-ASP-SER-ILE-LEU-ALA-VAL-ARG</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">125</td> <td style="text-align: center;">130</td> <td style="text-align: center;">135</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">LYS-TYR-PHE-GLN-ARG-ILE-THR-LEU-TYR-LEU-LYS-GLU-LYS-LYS-TYR-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">140</td> <td style="text-align: center;">145</td> <td style="text-align: center;">150</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">SER-PRO-CYS-ALA-TRP-GLU-VAL-VAL-ARG-ALA-GLU-ILE-MET-ARG-SER-</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">155</td> <td style="text-align: center;">160</td> <td style="text-align: center;">165</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="4">PHE-SER-LEU-SER-THR-ASN-LEU-GLN-GLU-SER-LEU-ARG-SER-LYS-GLU</td> </tr> </table> </div> </div>			1	5	10	15	CYS-ASP-LEU-PRO-GLN-THR-HIS-SER-LEU-GLY-SER-ARG-ARG-THR-LEU-				20	25	30		MET-LEU-LEU-ALA-GLN-MET-ARG-ARG-ILE-SER-LEU-PHE-SER-CYS-LEU-				35	40	45		LYS-ASP-ARG-ARG-ASP-PHE-GLY-PHE-PRO-GLN-GLU-GLU-PHE-GLY-ASN-				50	55	60		GLN-PHE-GLN-LYS-ALA-GLU-THR-ILE-PRO-VAL-LEU-HIS-GLU-MET-ILE-				65	70	75		GLN-GLN-ILE-PHE-ASN-LEU-PHE-SER-THR-LYS-ASP-SER-SER-ALA-ALA-				80	85	90		TRP-ASP-GLU-THR-LEU-LEU-ASP-LYS-PHE-TYR-THR-GLU-LEU-TYR-GLN-				95	100	105		GLN-LEU-ASN-ASP-LEU-GLU-ALA-CYS-VAL-ILE-GLN-GLY-VAL-GLY-VAL-				110	115	120		THR-GLU-THR-PRO-LEU-MET-LYS-GLU-ASP-SER-ILE-LEU-ALA-VAL-ARG				125	130	135		LYS-TYR-PHE-GLN-ARG-ILE-THR-LEU-TYR-LEU-LYS-GLU-LYS-LYS-TYR-				140	145	150		SER-PRO-CYS-ALA-TRP-GLU-VAL-VAL-ARG-ALA-GLU-ILE-MET-ARG-SER-				155	160	165		PHE-SER-LEU-SER-THR-ASN-LEU-GLN-GLU-SER-LEU-ARG-SER-LYS-GLU			
1	5	10	15																																																																																							
CYS-ASP-LEU-PRO-GLN-THR-HIS-SER-LEU-GLY-SER-ARG-ARG-THR-LEU-																																																																																										
20	25	30																																																																																								
MET-LEU-LEU-ALA-GLN-MET-ARG-ARG-ILE-SER-LEU-PHE-SER-CYS-LEU-																																																																																										
35	40	45																																																																																								
LYS-ASP-ARG-ARG-ASP-PHE-GLY-PHE-PRO-GLN-GLU-GLU-PHE-GLY-ASN-																																																																																										
50	55	60																																																																																								
GLN-PHE-GLN-LYS-ALA-GLU-THR-ILE-PRO-VAL-LEU-HIS-GLU-MET-ILE-																																																																																										
65	70	75																																																																																								
GLN-GLN-ILE-PHE-ASN-LEU-PHE-SER-THR-LYS-ASP-SER-SER-ALA-ALA-																																																																																										
80	85	90																																																																																								
TRP-ASP-GLU-THR-LEU-LEU-ASP-LYS-PHE-TYR-THR-GLU-LEU-TYR-GLN-																																																																																										
95	100	105																																																																																								
GLN-LEU-ASN-ASP-LEU-GLU-ALA-CYS-VAL-ILE-GLN-GLY-VAL-GLY-VAL-																																																																																										
110	115	120																																																																																								
THR-GLU-THR-PRO-LEU-MET-LYS-GLU-ASP-SER-ILE-LEU-ALA-VAL-ARG																																																																																										
125	130	135																																																																																								
LYS-TYR-PHE-GLN-ARG-ILE-THR-LEU-TYR-LEU-LYS-GLU-LYS-LYS-TYR-																																																																																										
140	145	150																																																																																								
SER-PRO-CYS-ALA-TRP-GLU-VAL-VAL-ARG-ALA-GLU-ILE-MET-ARG-SER-																																																																																										
155	160	165																																																																																								
PHE-SER-LEU-SER-THR-ASN-LEU-GLN-GLU-SER-LEU-ARG-SER-LYS-GLU																																																																																										
<p>α2c</p>																																																																																										

+ BENENNUNGEN VON "SU"

Es wird zur Zeit geprüft, in welchen Teilen der ehemaligen Sowjetunion die Benennung der Sowjetunion ihre Wirkung ausübt.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		



## O-glycosyliertes IFN-alpha

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind O-glycosylierte alpha Interferone, vorzugsweise ein Interferon alpha, im wesentlichen mit den biologischen und/oder immunologischen Eigenschaften eines IFN- $\alpha$ 2, Verfahren zu dessen Herstellung sowie die Verwendung der O-glycosylierten Interferone als Arzneimittel.

Seit der Entdeckung der Interferone vor mehr als dreißig Jahren werden ihre biologischen Eigenschaften als Mediatoren der interzellulären Kommunikation intensiv untersucht. Ursprünglich wurde die Bezeichnung der verschiedenen Arten von der jeweiligen Zelle, in der sie entstanden sind, abgeleitet (z.B. Leukocyten-IFN, Fibroblasten-IFN). Mit zunehmender Kenntnis ihrer Struktur wurde eine neue Nomenklatur eingeführt. Man unterscheidet zur Zeit vier Arten von Interferonen (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IFN- $\omega$ ), wobei IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$  zu den sogenannten "Klasse 1 Interferonen" zusammengefaßt werden, da sie ähnliche Strukturen und Eigenschaften aufweisen.

IFN- $\gamma$  wird von Lymphozyten, die durch Antigene oder mitogene Substanzen stimuliert werden, gebildet. Die Aminosäuresequenz, die keine Homologie zu den Klasse 1 Interferonen aufweist, enthält zwei potentielle N-Glycosylierungsstellen.

IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$  werden von verschiedenen Zellen als Reaktion auf Virusinfektion oder nach Induktion mit doppelsträngiger RNA synthetisiert.

Bei IFN- $\alpha$  handelt es sich eigentlich um eine ganze Gruppe von Proteinen. Bisher wurden mindestens 14 funktionelle Gene entdeckt, die für verschiedene

IFN- $\alpha$ -Typen kodieren. Diese Proteine sind nahe verwandt und weisen zumeist etwa 80-90% Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf. Mit Ausnahme von IFN- $\alpha$ 14 ist in keiner der übrigen IFN- $\alpha$ - Aminosäuresequenzen eine N-Glycosylierungsstelle (ASN-X-SER/THR) vorhanden. N-Glycosylierung ist somit in allen Fällen (außer IFN- $\alpha$ 14) auszuschließen, jedoch wurde O-Glycosylierung von IFN- $\alpha$  diskutiert (Labdon et al., Arch. Biochem. Biophys. 232, 422-426 (1984))

Viele in der Natur vorkommende Proteine werden posttranslational modifiziert, wobei Glycosylierung eine der häufigsten Modifikationen ist. Glycoproteine kommen membrangebunden oder löslich sowohl in der intra- als auch extrazellulären Matrix vor. Über die Funktion der Glycosylierung gibt es unterschiedliche Auffassungen. Gesichert ist, daß Glycane die Proteine vor proteolytischem Abbau schützen können oder daß sie in vielen Fällen für Zell-Zell-Wechselwirkungen verantwortlich sind. Weiterhin beeinflussen sie die Proteinfaltung und tragen zur Stabilität der Konformation des Moleküls bei. Auch die Löslichkeit der Proteine unterliegt dem Einfluß der Kohlenhydratketten.

Man unterscheidet zwischen N- und O-glycosylierten Proteinen. N-Glycane werden ausschließlich auf das ASN des Triplets -ASN-X-SER/THR- übertragen, wobei X jede beliebige Aminosäure mit Ausnahme von PRO oder GLU sein kann. Diese Anforderung an die Struktur des Proteins kann aber nur eine von mehreren sein, da nicht alle potentiellen Glycosylierungsstellen mit einem Kohlenhydrat besetzt sind. Für O-Glycane gibt es keine genau definierten Strukturmerkmale. Es gibt allerdings Hinweise darauf, daß O-Glycane bevorzugt in PRO-, SER- und THR-reichen Regionen synthetisiert werden. Das läßt vermuten, daß eher die sterische Zugänglichkeit der

Glycosylierungsstelle als eine bestimmte Aminosäuresequenz für die O-Glycosylierung bedeutend ist. Einflüsse der Glycosylierung auf die Pharmakokinetik sowie auf die immunologischen Eigenschaften des Proteins können nicht ausgeschlossen werden. So wurde kürzlich darüber berichtet (Gibbon et al., Lancet, 335, 434-437 (1990)), daß 4 von 16 Patienten, die mit rekombinantem humanem GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor), der in Hefe produziert worden war, behandelt worden waren, Antikörper gegen dieses Protein entwickelten. Man stellte fest, daß diese Antikörper mit Epitopen reagierten, die in endogenem GM-CSF durch O-Glycosylierung geschützt vorliegen, im rekombinanten Faktor jedoch frei zugänglich sind.

Im IFN- $\alpha$ 2 konnten bislang weder Kohlenhydratanteile nachgewiesen, noch konnte O-glycosyliertes IFN- $\alpha$  isoliert werden. Verschiedene Präparationen von natürlichem IFN- $\alpha$  und von rekombinantem IFN- $\alpha$ 2 sind als Medikamente gegen virale und Krebserkrankungen im Einsatz. Da dieses IFN- $\alpha$ 2 in E. coli produziert wird und daher nicht glycosyliert sein kann, scheint der Kohlenhydratanteil für die in vivo biologische Aktivität nicht bedeutend zu sein. In letzter Zeit mehren sich jedoch Berichte, daß Patienten, die längere Zeit mit rekombinantem, in E. coli produziertem IFN- $\alpha$ 2 behandelt wurden, Antikörper dagegen entwickelten (z.B. Figlin & Itri, Semin. Haematol. 25, 9-15 (1988)).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, ein neues IFN- $\alpha$ 2 bereitzustellen.

Gelöst wurde diese Aufgabe durch die Insertion der für IFN- $\alpha$ 2 kodierenden DNA Sequenz in einen speziellen Expressionsvektor, mit dem Zellen multizellulärer

Organismen transfiziert wurden. Nach Kultivierung dieser so modifizierten Zellen erhielt man überraschenderweise IFN- $\alpha$ 2-artige Proteine, die sich im Molekulargewicht eindeutig von dem bekannten rekombinanten IFN $\alpha$ 2 unterschieden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen, neuen Interferone eignen sich Kulturen von Zellen multizellulärer Organismen, insbesondere Kulturen von Wirbeltierzellen oder von Insektenzellen. Als Beispiele von Wirbeltierzelllinien sind VERO-Zellen, HeLa-Zellen, CHO-Zellen, WI38-Zellen, BHK-Zellen, COS-7-Zellen, MDCK-Zellen oder Maus-Myelomzellen zu nennen. Expressionsvektoren für diese Zellen enthalten wenn nötig eine Replikationsstelle, einen Promotor, falls erforderlich eine RNA-Splicing-Stelle, eine Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminations-Sequenzen. Die Kontrollfunktionen solcher Expressionsvektoren stammen üblicherweise aus viralem Material. Gebräuchliche Promotoren stammen aus Polyoma, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40), bevorzugt aus Cytomegalovirus (CMV). Die erforderliche Replikationsstelle kann entweder durch eine entsprechende Vektorkonstruktion vorgesehen werden, so beispielsweise die Replikationsstelle aus SV40, Polyoma, Adeno, VSV, oder PBV oder kann durch die chromosomalen Replikationsmechanismen der Wirtszelle vorgesehen werden. Bei Integration des Vektors in das Wirtszellenchromosom reicht die letztgenannte Maßnahme aus.

Erfindungsgemäß werden vorzugsweise Expressionsvektoren verwendet, die aus Teilen von Plasmiden neu konstruiert wurden. Diese erfindungsgemäßen Expressionsvektoren weisen eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen auf und lassen sich

vorzugsweise in E. coli mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren. Um die Expression heterologer Gene in Säugetierzellen zu ermöglichen, enthalten die erfindungsgemäßen Expressionsplasmide vorzugsweise den Cytomegalovirus (CMV) Promotor/Enhancer (M. Boshart et al., Cell 41, (1985), 521-530). Um die autonome Replikation der erfindungsgemäßen Expressionsplasmide zu hohen Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression in geeigneten Zelllinien wie beispielsweise in COS-7 oder in der mit Adenovirus transformierten Zelllinie 293 (ATCC CRL 1573), zu ermöglichen, wurde der SV40 Replikationsursprung verwendet. Zur Herstellung permanent transformierter Zelllinien und zur nachfolgenden Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster Minigen (Promotor mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker. Um die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA nach Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen, beispielsweise mit R408 oder M13KO7, zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA zu ermöglichen, enthielten vorzugsweise Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Plasmide die intergenische Region von M13. Wird in einer weiteren vorzugsweisen Ausgestaltung der T7 Promotor der Multiklonierstelle vorangestellt, wird dadurch die Herstellung von RNA Transkripten in vitro ermöglicht.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind die Expressionsplasmide pAD-CMV13, pAD-CMV15 insbesondere pAD-CMV19. Ihre Herstellung ist in Beispiel 1 ausführlich beschrieben.

Zur Erzielung einer verbesserten Expression und zur Erleichterung einer gerichteten Klonierung der für

IFN- $\alpha$ 2 kodierenden cDNA wurde die für IFN- $\alpha$ 2 kodierende cDNA mittels PCR in der 5'-nicht kodierenden Region erfindungsgemäß dahingehend modifiziert, daß die Sequenz dieser Region gegen die Sequenz der 5'-nicht kodierenden Region der humanen  $\beta$ -Globin mRNA (Lawn et al., Cell 21, (1980), 647-651) ausgetauscht wird. Gleichzeitig wurden an beiden Enden der cDNA Restriktionsenzymchnittstellen eingeführt, die eine gerichtete Klonierung erleichtern. Überraschenderweise bewirkt eine derartige Veränderung eine deutliche Erhöhung der Expression.

Die so modifizierte cDNA für IFN- $\alpha$ 2 wurde in ein mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenes erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, vorzugsweise in das Plasmid pAD-CMV19 inseriert. Mit den so erhaltenen Expressionsplasmiden für IFN- $\alpha$ 2 wurden geeignete Säugetierzellen transfektiert, die daraufhin in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert wurden. Der Kulturüberstand der Säugetierzellen wurde in an sich bekannter Weise unter schonenden Bedingungen gereinigt. Vorzugsweise verwendet man affinitätschromatographische Reinigungsverfahren mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen IFN- $\alpha$ 2. Bevorzugte monoklonale Antikörper sind EBI-1 oder EBI-10 beziehungsweise deren Äquivalente. Die Herstellung dieser hochspezifischen Antikörper ist beschrieben (Adolf G.R. J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987); Adolf et al. J. Cell. Physiol. suppl. 2, 61-68 (1982)). Die zu verwendenden Methoden sind ebenfalls beschrieben (Secher und Burke, Nature 285, 446-450 (1980); Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990); Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991)). Besonders vorteilhaft ist das Reinigungsverfahren gemäß EPA 0 203 382 zu verwenden, wobei auf das Aufbrechen der Zellen verzichtet werden kann. Zur Charakterisierung von rekombinantem, in Säugetierzellen

hergestelltem IFN- $\alpha$ 2 wurde die Reverse Phase HPLC verwendet. Der N-Terminus und C-Terminus wurden analysiert. Zum Vergleich wurde jeweils rekombinantes, in E. coli hergestelltes IFN- $\alpha$ 2c verwendet. Anhand SDS-Gelelektrophoretischer Untersuchungen war festzustellen, daß das in Säugetierzellen hergestellte rekombinante IFN- $\alpha$ 2 ein höheres Molekulargewicht aufwies, als das in E. coli hergestellte IFN- $\alpha$ 2. Nach Behandlung beider rekombinanter Interferone mit NaOH reduzierte sich das Molekulargewicht des in Säugetierzellen hergestellten, rekombinanten IFN- $\alpha$ 2's auf das Molekulargewicht des in E. coli hergestellten IFN- $\alpha$ 2's. In Säugetierzellen exprimiertes, rekombinantes IFN- $\alpha$ 2 muß daher glycosyliert sein. Bei der Identifizierung der Glycopeptide mittels Peptide Mapping und Sequenzanalyse konnte festgestellt werden, daß das an Position 106 befindliche Threonin (THR-106) die Glycosylierung trägt. Bei einem Vergleich der Resultate mit denen, die beim natürlichen IFN- $\alpha$ 2 aus virusstimulierten Leukocyten erhalten wurden (s. unten) zeigte es sich, daß sowohl die Glycosylierungsstelle als auch der Oligosaccharidanteil weitgehend identisch sind.

Gelöst wurde die erfindungsgemäße Aufgabe aber auch durch ein Reinigungsverfahren, das keine Verfahrensschritte enthält, die evtl. vorhandene Substitutionen des IFN- $\alpha$ 2 verändern oder eliminieren. Das erfindungsgemäße Reinigungsverfahren bediente sich hochspezifischer monoklonaler Antikörper, wobei während des gesamten Reinigungsverfahrens alkalische Bedingungen mit einem pH-Wert größer als 8,0 sorgsam vermieden wurden.

Natürliches humanes IFN- $\alpha$ 2 wurde mit Hilfe eines hochspezifischen monoklonalen Antikörpers aus

Leukozyteninterferon isoliert. Zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte über eine Immunoaffinitätssäule führten zu einer Reinheit des Proteins von >95%. Die Sequenzanalyse ergab die erwartete N-terminale Sequenz, wobei CYS als erste Aminosäure nur indirekt nachgewiesen wurde.

Von IFN- $\alpha$ 2 sind bisher drei Varianten, die sich in den Aminosäuren an den Positionen 23 und 34 unterscheiden, bekannt: IFN- $\alpha$ 2a mit <sup>23</sup>LYS und <sup>34</sup>HIS (früher als Le IFA bezeichnet; Goeddel et al., Nature, 290, 20-26 (1981)), IFN- $\alpha$ 2b mit <sup>23</sup>ARG und <sup>34</sup>HIS (Streuli et al., Science, 209, 1343-1347 (1980)) und IFN- $\alpha$ 2c mit <sup>23</sup>ARG und <sup>34</sup>ARG (früher als IFN- $\alpha$ 2"Arg" bezeichnet; Dworkin-Rastl et al., J. Interferon Res.-2, 575-585 (1982); Bodo & Maurer-Fogy, The Biology of the Interferon System 1985 (Stewart II, W.E. & Schellehus H. Hrsg.) 59-64 (1986)). Bei dem isolierten Interferon konnte an Position 23 nur ARG nachgewiesen werden, was das Vorhandensein von IFN- $\alpha$ 2a ausschließt. Die Aminosäure an Position 34 war eindeutig Histidin, so daß es sich bei dem isolierten Interferon um IFN- $\alpha$ 2b handelte. Ebenso sind jedoch auch die Varianten IFN- $\alpha$ 2a bzw. IFN- $\alpha$ 2c erhältlich je nachdem, welches Zellmaterial als Ausgangsmaterial verwendet wird. Es ist bekannt, daß in Namalwa-Zellen neben IFN- $\alpha$ 2b auch IFN- $\alpha$ 2c zu finden ist. Bei dem als Vergleichssubstanz verwendeten rekombinanten Interferon aus E. coli handelte es sich um IFN- $\alpha$ 2c.

RP-HPLC-Analysen des gereinigten natürlichen IFN- $\alpha$ 2 zeigten, daß die Präparation zwei Peaks enthielt, die beide früher von der Säule eluierten als das rekombinante E. coli-IFN- $\alpha$ 2c. Auch mittels SDS-PAGE konnte eine starke Heterogenität in der scheinbaren



molekularen Masse von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 nachgewiesen werden. Alle in natürlichem IFN- $\alpha$ 2 nachgewiesenen Proteine hatten eine wesentlich höhere scheinbare molekulare Masse als rekombinantes IFN- $\alpha$ 2c aus E. coli. Sämtliche bisher beschriebene IFN- $\alpha$ -Spezies - mit Ausnahme von IFN- $\alpha$ 14 - weisen keine N-Glycosylierungsstelle (-ASN-X-THR/SER-) auf. Somit kann auch für IFN- $\alpha$ 2 N-Glycosylierung ausgeschlossen werden. Für O-Glycane kennt man solche Strukturmerkmale nicht. Nicht auszuschließen ist daher, daß das vorliegende IFN- $\alpha$ 2 O-glycosyliert ist.

Da O-Glycane schon unter schwach alkalischen Bedingungen vom Protein abgespalten werden können, wurden beide Peakfraktionen schwach alkalischen Bedingungen unterworfen. Diese Reaktion führte in beiden Fällen zu einer Reduktion der scheinbaren molekularen Masse auf die des rekombinanten IFN- $\alpha$ 2c aus E. coli; ein deutlicher Hinweis auf O-Glycosylierung.

Versuche mit Neuraminidase und O-Glycanase ergaben für den einen Peak (Peak 2) (s. Fig. 14) ebenfalls eine Reduktion der scheinbaren molekularen Masse auf jene von E. coli-IFN- $\alpha$ 2c und bestätigten damit die O-Glycosylierung. Die Ergebnisse dieses sequentiellen Abbaues des Glycans mit Neuraminidase und O-Glycanase zeigten, daß die Heterogenität des Peak 2 auf dem unterschiedlichen Gehalt von N-Acetylneuraminsäure (NeuAc = Sialinsäure) beruhte. Die drei Banden (Fig. 20, Spur 4) repräsentierten die di- bzw. monosialylierte (Mr 21.000 bzw. 20.000) und die nichtsialylierte (Mr 19.000) Form des natürlichen IFN- $\alpha$ 2. Die leichteste Form des IFN- $\alpha$ 2 konnte durch Reaktion mit O-Glycanase allein abgebaut werden. Da O-Glycanase nur das unsubstituierte Disaccharid

Gal(B1-3)GalNAc spaltet, ist die Reaktion als Beweis dafür anzusehen, daß neben den beiden sialylierten Formen auch eine Asialo-Variante des IFN- $\alpha$ 2 existiert.

Die scheinbare molekulare Masse von Peak 1 hingegen konnte mittels Enzymreaktionen nicht reduziert werden. Inkubation mit Neuraminidase führte nicht wie erwartet zu einer Reduktion der scheinbaren molekularen Masse. Das Disaccharid-Core mußte demnach anders als mit NeuAc substituiert sein und konnte daher nicht durch O-Glycanase abgespalten werden.

Durch Vergleich der Peptide Maps nach Trypsinspaltung von natürlichem und rekombinantem, in E. coli exprimiertem IFN- $\alpha$ 2 konnten die Glycopeptide aus den Peaks 1 und 2 identifiziert werden. Die Sequenzierung dieser Glycopeptide ergab <sup>106</sup>THR als Glycosylierungsstelle.

Hinweise auf die Struktur der Oligosaccharide des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 gaben neben den Enzymreaktionen auch massenspektrometrische Untersuchungen der Glycopeptide. Die Interpretation der Massenspektren zusammen mit den Ergebnissen der SDS-PAGE ergaben, daß natürliches IFN- $\alpha$ 2 zumindest vier verschiedene Glycanstrukturen enthält: im Peak 2 das neutrale Disaccharid Gal(B1-3)GalNAc, dessen Struktur aufgrund der hohen Spezifität der O-Glycanase mit großer Sicherheit anzunehmen ist, außerdem die mono- und die disialylierte Variante; im Peak 1 ein neutrales Oligosaccharid, bestehend aus zwei Hexose- und zwei N-Acetylhexosamin-Einheiten. Als Struktur dieses Tetrasaccharides kann in Analogie zu bereits beschriebenen häufiger vorkommenden O-Glycanen vorgeschlagen werden: Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc.

Durch die vorliegende Erfindung konnte überraschenderweise erstmals O-glycosyliertes IFN- $\alpha$ 2 in hochreiner Form bereitgestellt werden. Dieses Interferon ist an der Aminosäure Threonin an Position 106 (<sup>106</sup>THR) O-glycosyliert. Die Oligosaccharide, die an dieser Position enthalten sein können, sind das neutrale Disaccharid Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc, dessen mono- und disialylierte Varianten sowie ein neutrales Tetrasaccharid Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc.

Dieses O-glycosylierte IFN- $\alpha$ 2 kann in an sich bekannter Weise, in Analogie zum rekombinanten in E. coli exprimierten IFN- $\alpha$ 2, formuliert und in allen, für IFN- $\alpha$  bekannten Indikationen zur Behandlung eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Proteine können für die Behandlung der viralen Infektionen und von malignen Erkrankungen in der Form von pharmazeutischen Präparaten verwendet werden, die eine wirksame Menge des IFN's gegebenenfalls zusammen mit einer signifikanten Menge eines anorganischen oder organischen, festen oder flüssigen, pharmazeutisch verwendbaren Trägerstoffes enthalten.

Bevorzugt sind pharmazeutische Präparate zur parenteralen, beispielsweise intramuskulären, subkutanen oder intravenösen Verabreichung am Menschen. Solche Präparate sind isotonische wässrige Lösungen oder Suspensionen, die die erfindungsgemäßen Proteine enthalten, gegebenenfalls zusammen mit einem Trägermaterial und, wenn erwünscht, Hilfsmittel, beispielsweise Stabilisatoren, Emulgiermittel, lösungsvermittelnde Stoffe, Salze für die Regulierung des pH und des osmotischen Druckes, Konservierungsmittel und/oder Netzmittel. Die pharmazeutischen Präparationen

können nach an sich bekannten Methoden hergestellt werden, beispielsweise in einem Verfahren, worin die erfindungsgemäßen Proteine und die pharmazeutisch verwendbaren Träger und Hilfsstoffe gemischt, gewünschtenfalls lyophilisiert und vor Verwendung gelöst werden.

Die Dosierung der pharmazeutischen Präparate hängt von der zu behandelnden Krankheit, dem Körpergewicht, Alter und individuellen Zustand des Patienten gemäss Einschätzung des behandelnden Arztes und der Applikationsweise ab.

Durch die vorliegende Erfindung wird daher erstmals ein O-glycosyliertes Interferon- $\alpha 2$  enthaltendes Mittel bereitgestellt, das aufgrund der antiviralen und antineoplastischen Eigenschaften des IFN- $\alpha 2$  u.a. zur Behandlung von viralen und tumoralen Erkrankungen geeignet ist.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern ohne sie einzuschränken.

#### Legenden zu den Figuren

- Fig. 1: Konstruktion des Plasmides pCMV+SV40
- Fig. 2: Konstruktion des Plasmides pAD-CMV10A
- Fig. 3: Konstruktion des Plasmides pAD-CMV15
- Fig. 4: Konstruktion der Plasmide pAD-CMV13 und pAD-CMV19
- Fig. 5: Konstruktion des Expressionsplasmides pAD 19B-IFN

- Fig. 6: HindIII/XbaI-Insert des Expressionsplasmides pAD19B-IFN
- Fig. 7: DNA-Sequenz des Plasmides pAD-CMV19
- Fig. 8: Konstruktion des Plasmides pCMV-SV40
- Fig. 9: Konstruktion des Plasmides pSV2gptDHFRMut2
- Fig. 10: Konstruktion der Plasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2
- Fig. 11: DNA-Sequenz des Plasmides pAD-CMV1
- Fig. 12: Monoklonale Antikörper Affinitätschromatographie des humanen Leukozyten Interferons
- Fig. 13: ELISA für human IFN- $\alpha$ :  
(O) Referenzpräparation des rekombinanten human IFN- $\alpha$ 2c; (O) Leukozyteninterferon (Ausgangsmaterial) (□) Durchfluß (□) eine Fraktion des Eluates A; (Δ) eine Fraktion des Eluates B
- Fig. 14: RP-HPLC des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 (b) und E. coli IFN- $\alpha$ 2c (a)
- Fig. 15: Aminosäuresequenz des IFN- $\alpha$ 2c
- Fig. 16: SDS-PAGE von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 vor und nach Reaktion mit Neuraminidase und O-Glycanase. (1) Peak 1, unbehandelt; (2) Peak 1, nach Reaktion mit Neuraminidase; (3) Peak 1, nach Reaktion mit Neuraminidase

und O-Glycanase; (4) Peak 2, unbehandelt;  
(5) Peak 2, nach Reaktion mit  
Neuraminidase; (6) Peak 2, nach Reaktion  
mit Neuraminidase und O-Glycanase; (7) E.  
coli-IFN- $\alpha$ 2c

Fig. 17: SDS-PAGE von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 (Peak 2  
aus Fig. 14b) vor (1) und nach (2) Reaktion  
mit O-Glycanase.

Fig. 18: SDS-PAGE von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 (Peak 1  
und 2) und E. coli-IFN- $\alpha$ 2c nach Inkubation  
mit 0.1 M NaOH. (1) E. coli-IFN- $\alpha$ 2; (3)  
Peak 1; (5) Peak 2; unbehandelte  
Vergleichsproben von Peak 1 (2) und von  
Peak 2 (4) wurden ebenfalls aufgetragen.

Fig. 19: Vergleichendes Peptide Map von E.  
coli-IFN- $\alpha$ 2c und natürlichem IFN- $\alpha$ 2. (1)  
Peak 1 aus Fig. 14b; (2) Peak 2 aus Fig.  
14b; \*, diese Peaks stammen von  
unglycosylierten Peptiden, deren  
Retentionszeit immer gleich war.

Fig. 20: SDS-PAGE von natürlichem IFN $\alpha$ 2 und  
E. coli-IFN $\alpha$ 2c. (1)  
Molekulargewichtsmarker; (2) E.  
coli-IFN $\alpha$ 2c; (3) natürliches IFN- $\alpha$ 2,  
Peak 1 aus Fig. 14b; (4) natürliches  
IFN- $\alpha$ 2, Peak 2 aus Fig. 14b; Färbung:  
Coomassie-Blue.

Fig. 21: Reverse Phase HPLC (RP-HPLC) des  
CHO-IFN- $\alpha$ 2c (a) und des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c  
(b)

Fig. 22: Vergleichende Peptide Maps von Peak 1 (a) und Peak 2 (b) aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c und von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (c)

Fig. 23: SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von CHO-IFN- $\alpha$ 2c und E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Spuren 1 und 8: Molekulargewichtsmarker (Skala in kD); Spuren 2-4: nichtreduzierende Bedingungen, Spuren 5-7: reduzierende Bedingungen;

Spuren 2 und 5: Peak 1 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c;

Spuren 3 und 6: Peak 2 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c;

Spuren 4 und 7: E.coli-IFN- $\alpha$ 2c;

Oberes Gel: Alle IFN-Spuren mit je 4  $\mu$ g;

Unteres Gel: Alle IFN-Spuren mit je 1  $\mu$ g;  
Färbung: Coomassie Blue

Fig. 24: SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von CHO-IFN- $\alpha$ 2c und E.coli-IFN- $\alpha$ 2c vor und nach Inkubation mit 0,1 M NaOH.

Spuren 1 und 8: Molekulargewichtsmarker (Skala in kD); Spuren 2, 4, 6: unbehandelte Proben, Spuren 3, 5, 7: mit 0,1 M NaOH inkubierte Proben;

Spuren 2, 3: E.coli-IFN- $\alpha$ 2c,

Spur 4, 5: Peak 1 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c,

Spur 6, 7: Peak 2 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c;

Auf alle IFN-Spuren wurden je etwa 1,5  $\mu$ g  
unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen.

Färbung: Coomassie Blue

#### Beispiel 1

Konstruktion der Expressionsplasmide pAD-CMV13,  
pAD-CMV15 und pAD-CMV19

Aus Teilen von Expressionsplasmiden (pCDM8, Seed & Aruffo, Proc. Natl.Acad.Sci.USA 84 (1987) 8573-8577; B. Seed, Nature 329 (1987) 840-842); Invitrogen, Inc., San Diego, CA; pSV2gptDHFR20, EP-A1 0321842) und -- dem Plasmid pBluescript KS- (Short et al., Nucleic Acids Res., 11 (1988) 5521-5540; Stratagene, La Jolla, CA)) wurden neue Plasmide konstruiert, die eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen aufweisen und sich in E.coli mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren lassen. Die intergenische Region von M13 ermöglicht die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA nach Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen (z.B. R408 oder M13K07), zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA. Der T7 Promotor, der der Multiklonierstelle vorangeht, ermöglicht in vitro die Herstellung von RNA Transkripten. In Säugetierzellen erfolgt die Expression heterologer Gene getrieben vom Cytomegalovirus (CMV) Promotor / Enhancer (M. Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530). Der SV40 Replikationsursprung ermöglicht in geeigneten Zelllinien (z.B. SV40 transformierte Zellen wie COS-7, Adenovirus transformierte Zelllinie 293 (ATCC CRL1573)) die



autonome Replikation des Expressionsplasmides zu hohen Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression. Für die Herstellung permanent transformierter Zelllinien und die nachfolgende Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster Minigen (Promotor mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker.

Herstellung der Vektor- und Promotoranteile durch Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Das Plasmid pBluescript KS- wurde mit HindIII linearisiert und 100 ng DNA in einem 100 µl PCR (Saiki et al., Science 239 (1988) 487-491) Ansatz eingesetzt (Reaktionsmedium: 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% (w/v) Gelatine, 0,2 mM jeder der vier Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 units Taq Polymerase pro 100 µl). Als Primer wurden je 50 pmol der synthetischen Oligonukleotide EBI-1786 (5'-GGAATTCAGCCTGAA- TGGCGAATGGG-3') und EBI-2134 (5'-CACTGAAC TCGAGCAGC- TGGCTTGCTGGCGTTTTTCC-3') eingesetzt. Nach 5 Minuten Denaturieren bei 94°C erfolgte die PCR über 10 Zyklen (Zyklusbedingungen: 40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 5 Min bei 72°C, Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler). Die Oligonukleotide flankieren die intergenische Region von M13 bzw. den Replikationsursprung (ori) mit dem dazwischenliegenden Gen für die β-Lactamase. Gleichzeitig wird am Ende des ori eine XhoI- und eine PvuII- und am anderen Ende eine EcoRI-Schnittstelle erzeugt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform von Protein befreit und die DNA

mit Äthanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde mit XhoI und EcoRI geschnitten und nach Elektrophorese in einem Agarosegel ein Fragment mit 2,3 kb isoliert. 50 ng mit SacII linearisiertes Plasmid pCDM8 wurde mit den Oligonukleotiden EBI-2133 (5'-GGTCACTGTCGACAT-TGATTATTGACTAG-3') und EBI-1734 (5'-GGAATTCCT-AGGAATACAGCGG-3') unter identischen Bedingungen wie zuvor beschrieben durch PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide binden am Beginn der CMV-Promotor / Enhancer Sequenz und erzeugen eine SalI Schnittstelle (EBI-2133), bzw. binden am Ende der SV40 poly-Adenylierungsstelle und erzeugen eine EcoRI Schnittstelle (EBI-1734). Das PCR Produkt wurde mit SalI und EcoRI geschnitten und ein DNA Fragment von 1,8 kb aus einem Agarosegel isoliert.

Die beiden nachgeschnittenen PCR Produkte wurden mit T4 DNA-Ligase ligiert und E.coli HB101 transformiert. Ein Plasmid der gewünschten Struktur (siehe Fig.1) wurde pCMV+M13 benannt.

Der SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321842) isoliert. Dazu wurde dieses Plasmid mit HindIII und PvuII doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch nachfolgende Behandlung mit dem großen Fragment der E.coli DNA Polymerase (Klenow Enzym) in Gegenwart der vier Desoxynukleotidtriphosphate stumpf gemacht. Ein entstandenes 0,36 kb DNA Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und in mit EcoRI linearisiertem Plasmidvektor pCMV+M13 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli HB101 erhaltenes Plasmid, das den SV40 ori in gleicher Orientierung wie  $\beta$ -Lactamase Gen und CMV-Promotor enthielt, wurde pCMV+SV40 benannt (Fig.1).

Plasmid pCMV+SV40 wurde mit EcoRI und BamHI doppelt geschnitten und die DNA-Enden anschließend mit Klenow-Enzym stumpf gemacht. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Äthanol-fällung gereinigt. Ein Teil der DNA wurde mit T4 DNA Ligase zirkularisiert und ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid pAD-CMV10 benannt (Fig.2). Der Rest der pCMV+SV40 DNA wurde durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und der 4,4 kb lange Vektor aus einem Agarosegel isoliert.

Plasmid pSV2gptDHFR-Mut2 (siehe Beispiel 4, Fig. 9), das ein modifiziertes Hamster Dihydrofolatreduktase (DHFR) Minigen enthält, aus dem durch gerichtete Mutagenese die Restriktionsenzym-schnittstellen für EcoRI, PstI, BglII, BamHI und KpnI entfernt wurden, wurde mit EcoRI und PstI doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch 20 Minuten Inkubation bei 11°C mit 5 units T4 DNA-Polymerase (Reaktionsmedium: 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate, 50 µg/ml Rinderserumalbumin) stumpf gemacht. Das 2,4 kb lange DNA-Fragment mit dem mutierten DHFR-Gen wurde aus einem Agarosegel isoliert und mit dem wie oben beschriebenen präparierten pCMV+SV40 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid, in dem das DHFR-Gen in derselben Orientierung wie der CMV-Promotor enthalten war, wurde pAD-CMV10A benannt (Fig.2).

Ausgehend vom Expressionsplasmid pAD-CMV1 (siehe Beispiel 4, Fig. 10), das zwischen Multiklonierstelle und poly-Adenylierungssignal eine Intronsequenz enthält, wurden mehrere Varianten hergestellt, die sich durch die Anzahl und Lage der Introns relativ zur Multiklonierstelle unterscheiden. In pAD-CMV13 (Fig. 4)

wurde das SV40 t Antigen Intron zwischen Multiklonierstelle und poly-Adenylierungsstelle deletiert; pAD-CMV15 (Fig. 3) enthält ein synthetisches Intron zwischen CMV Promotor und Multiklonierstelle und das SV40 t Antigen Intron zwischen Multiklonierstelle und poly-Adenylierungssignal; pAD-CMV19 (Fig. 4) enthält nur ein Intron zwischen CMV Promotor und Multiklonierstelle.

Ausgehend von 100 ng des mit HindIII linearisierten Plasmid pAD-CMV1 wurde mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2625 (5'-CACTGATCTAGAGATATCTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG-3') und EBI-1857 (5'-GGCAAGGGCAGCAGCCGG-3') in 100 µl PCR Ansatz (siehe oben) in 10 PCR Zyklen (40 sec 94°C, 45 sec 55°C, 90 sec 72°C) ein 1,26 kb langes DNA Fragment amplifiziert. EBI-2625 bindet kurz vor dem SV40 poly-Adenylierungssignal (Position 1280 in pAD-CMV1) und enthält zusätzliche Restriktionsschnittstellen für XbaI und EcoRV. EBI-1857 bindet am komplementären DNA Strang im ersten Intron des nachfolgenden DHFR Minigens (Position 2525 in pAD-CMV1). Das PCR Produkt wurde durch Extraktion mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol gefällt. Die DNA wurde mit XbaI und BglII doppelt geschnitten, ein 0,32 kb langes DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert und in mit den gleichen Enzymen doppelt geschnittenen Plasmidvektor (5,8 kb) pAD-CMV1 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli HB101 erhaltenes Plasmid der gewünschten Beschaffenheit (siehe Fig.4) wurde pAD-CMV13 benannt.

Die dem CMV Promotor folgende Spleiß-Donor Sequenz (M. Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530) wurde durch SOE-PCR (splicing by overlap extension; S.N. Ho et al., Gene 77 (1989) 51-59) mit der Spleiß-Acceptorstelle

des ersten Introns des humanen  $\beta$ -Globin Gens (Lawn et al., Cell 21 (1980) 647-651) gefolgt von der Multiklonierstelle von Plasmid pAD-CMV1 verbunden. Dazu wurden 100 ng Plasmid pGJ7 (G. Jahn et al., J. Virology 49 (1984) 363-370) enthaltend die Promotor und Enhancer Sequenz von humanem Cytomegalovirus StammAD169 (Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530) mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2133 (siehe oben) und EBI-2586 (5'-GCAGAGAGAGTCAGTGCCTATCAGAAACCCAAGAG-TCTTCTCTATAGGCGGTACTTACCTGACTCTTG-3') in 100  $\mu$ l PCR Reaktionsgemisch über 30 Zyklen amplifiziert (Zyklusbedingungen: 40 sec 94°C, 45 sec 45°C, 90 sec 72°C). Die letzten 24 Basen von EBI-2586 passen perfekt an die CMV-Sequenz (in antisense Orientierung) und die vorangehenden Basen entsprechen der  $\beta$ -Globin Intron Sequenz, wobei 18 Basen perfekt zur revers komplementären Sequenz von Oligonukleotid EBI-2585 passen und die überlappende DNA-Sequenz für die SOE-PCR bilden. Die PCR Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und ein 0,8 kb DNA Fragment isoliert (Fig.3). 100 ng Plasmid pAD-CMV1 wurden in gleicher Weise mit den Oligonukleotiden EBI-2585 (5'-GCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGCTTAAGTGGCTTATCG-3') und EBI-2112 (5'-GTCCAATTATGTCACACC-3') durch PCR amplifiziert und ein 0,2 kb DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert. EBI-2585 enthält die letzten 45 Basen des  $\beta$ -Globin Introns und die fünf darauf folgenden Basen, sowie 17 Basen am 3'-Ende, die perfekt an Position 611-627 der pAD-CMV1 Sequenz hybridisieren können. EBI-2112 bindet am komplementären DNA Strang an Position 743-760 an die pAD-CMV1 Sequenz. 1/10 des isolierten 0,8 kb DNA Fragments und 1/30 des 0,2 kb DNA Fragments wurden in einem neuen 100  $\mu$ l PCR Ansatz (SOE-PCR) gemischt und mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2133 und EBI-2112 in 30 PCR Zyklen (40 sec 94°C, 45 sec 45°C, 2

Min 72°C) amplifiziert. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Phenol und Chloroform gestoppt und die DNA mit Äthanol gefällt. Die 5'-Enden des PCR Produktes wurden mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert (Reaktionspuffer: 70 mM Tris-Cl pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP) und anschließend mit XbaI geschnitten. Die DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und ein Fragment von 0,98 kb Länge isoliert. Plasmid pAD-CMV10 wurde mit PvuII und XbaI doppelt geschnitten und der Vektoranteil ohne CMV Promotor aus einem Agarosegel isoliert. Dieser Plasmidvektor wurde mit dem 0,97 kb DNA Fragment, enthaltend den CMV Promotor und Enhancer mit Intron und Multiklonierstelle, ligiert und E.coli HB101 transformiert. Von den erhaltenen Transformanten wurde Plasmid DNA hergestellt und das neue DNA Insert mit den Oligonukleotiden EBI-2112, EBI-2586 und EBI-1733 (5'-GGTCGACATTGATTATTGACTAG-3') nach der Dideoxy-Kettenabbruch Methode (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci.USA 74 (1977) 5463-5467) mit modifizierter T7 DNA Polymerase (S. Tabor and C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 84 (1987) 4767-4771); Sequenase, United States Biochemical Corp.) sequenziert. Ein Plasmid mit der erwarteten Sequenz wurde pAD-CMV15 benannt (Fig.3).

pAD-CMV10A wurde mit SpeI und BglII doppelt geschnitten und der Vektoranteil ohne CMV Promotor aus einem Agarosegel isoliert. pAD-CMV15 wurde mit SpeI und HindIII doppelt geschnitten und ein 0,8 kb DNA Fragment enthaltend den CMV Promotor und das synthetische Intron, isoliert. pAD-CMV13 wurde mit HindIII und BglII doppelt geschnitten und ein 0,36 kb DNA Fragment isoliert, das die Multiklonierstelle, das SV40 early poly-Adenylierungssignal und einen Teil der Hamster-DHFR Promotorregion enthielt. Diese drei DNA Fragmente

wurden mit T4 DNA Ligase ligiert und E.coli HB101 transformiert. Von den erhaltenen Transformanten wurde Plasmid DNA hergestellt und durch Schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen charakterisiert. Ein Plasmid der gewünschten Struktur wurde pAD-CMV19 benannt (Fig.4, Fig.5).

## Beispiel 2

### Herstellung einer modifizierten cDNA für huIFN- $\alpha$ 2c

Die für humanes IFN- $\alpha$ 2c kodierende cDNA des Klons 1F7 (E. Dworkin-Rastl et al., J.Interferon Res. 2 (1982) 575-585; E. Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237-248) wurde mittels PCR in der 5'-nicht kodierenden Region modifiziert, indem diese gegen die Sequenz der 5'-nicht kodierenden Region der humanen  $\beta$ -Globin mRNA (Lawn et al., Cell 21 (1980) 647-651) ausgetauscht wurde. Eine derartige Veränderung der 5'-nicht kodierenden Region bewirkt eine deutliche Erhöhung der Expression, möglicherweise durch eine effizientere Initiation der Translation. Gleichzeitig wurden an beiden Enden der cDNA Restriktionsenzymchnittstellen eingeführt, die eine nachfolgende gerichtete Klonierung der cDNA in Expressionsplasmide erleichterten.

100 ng mit EcoRI linearisiertes Plasmid 1F7 wurden mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2747 (5'-CTTCAGAAGCTTACATTTGCTTCTGACACAAGTGTGTTCACTAGCAACCT-CAAACAGACACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-3') und EBI-2744 (5'-GACTTCAGTCTAGAGAACCAGTTTTCATTCTTACTTC-3') in 100  $\mu$ l PCR Ansatz in 20 Zyklen (40 sec 94°C, 45 sec 55°C, 90 sec 72°C) amplifiziert. EBI-2747 enthält nach einer HindIII Schnittstelle die 5'-nicht kodierende Region der humanen  $\beta$ -Globin mRNA gefolgt von den ersten 22 Basen der für das Signalpeptid von huIFN- $\alpha$ 2c

kodierenden Sequenz (Startkodon ist unterstrichen). EBI-2744 bindet am komplementären Strang am Ende der für huIFN- $\alpha$ 2c kodierenden Sequenz (Stopkodon ist unterstrichen) und enthält eine Schnittstelle für XbaI. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Phenol und Chloroform gestoppt und die DNA mit Äthanol gefällt. Das PCR Produkt wurde mit HindIII und XbaI an den Enden nachgeschnitten und das 0,64 kb lange DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert (Fig.6, Fig.7). Plasmid pAD-CMV19 wurde ebenfalls mit HindIII und XbaI doppelt geschnitten und anschließend mit dem cDNA Fragment ligiert. Nach Transformation von E.coli HB101 erhaltene Kolonien wurden zur Präparation von Plasmid DNA gezüchtet. Eines der erhaltenen Plasmide wurde über den Verlauf des insertierten HindIII-XbaI Bereiches vollständig sequenziert. Mit Ausnahme eines einzigen Basenaustausches (CTG zu TTG) im 8. Kodon des Signalpeptides, der jedoch zu keiner Änderung der kodierten Aminosäure (Leu) führte, wurde die erwartete Sequenz erhalten. Das Expressionsplasmid für sekretiertes und O-glycosyliertes huIFN- $\alpha$ 2c wurde pAD19B-IFN benannt (Fig.6).

Beschreibung der Sequenzelemente von Plasmid pAD-CMV19 (Fig.5)

Basen

- |     |   |     |   |
|-----|---|-----|---|
| 1   | - | 21  | Bindungsstelle von Oligonukleotid EBI-2133                  |
| 1   | - | 590 | Cytomegalovirus Enhancer und Promotor                       |
| 722 | - | 740 | Intronsequenz von Cytomegalovirus (Splice Donor)            |
| 741 | - | 805 | Intronsequenz von humanem $\beta$ -Globin (Splice Acceptor) |
| 836 | - | 853 | T7 Promotor   |
| 862 | - | 922 | Multiklonierstelle  |



923	-1055	Polyadenylierungsstellen von SV40
1056	-1953	Promotor und 5'-nicht kodierende Region von Hamster DHFR Gen
1954	-2039	DHFR Exon 1
2040	-2333	DHFR Intron 1
2151	-2168	Bindungsstelle von EBI-1857
2344	-2821	DHFR Exons 2-6 kodierender Bereich
2822	-3474	DHFR 3'-nicht kodierende Region
3475	-3812	SV40 Replikationsursprung (SV40 ori)
3813	-6055	pBluescript Anteil
3813	-4291	M13 intergenische Region (M13 ori)
4423	-5283	$\beta$ -Lactamase, kodierende Region
6038	-6062	Bindungsstelle von EBI-2134

### Beispiel 3

#### Transiente Expression von huIFN- $\alpha$ 2c in höheren eukaryotischen Zellen

Etwa  $10^6$  Zellen (293, humane embryonale Nierenzellen transformiert mit einem Teil des Adenovirus AD5 Genoms; F.L. Graham et al., J.Gen.Virol., 36 (1977) 59-77; ATCC CRL1573) pro 80 mm Petrischale wurden 24 Stunden vor der Transfektion mit Medium (Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 (1:1) mit 15 mM Hepes; Gibco) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum angesetzt und bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden 3 Stunden vor der Transfektion mit 10 ml frischem Medium versehen und bei 37°C inkubiert. 10 µg Plasmid DNA (gereinigt durch zweimalige CsCl Dichtegradientenzentrifugation) pAD19B-IFN gelöst in 0,5 ml 250 mM CaCl<sub>2</sub> wurden tropfenweise zu 0,5 ml 2x HBS (16,36 g/l NaCl, 11,9 g/l Hepes, 0,40 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,12) zugefügt. Das entstandene Präzipitat wurde zu einer Petrischale zugegeben und die Zellen weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen

wurden mit PBS gewaschen, 30 Sekunden mit 15% Glyzerin in 1x HBS geschöckt, nochmals mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Medium mit 10% Kälberserum bei 37°C inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet und zum Nachweis des sekretierten IFN verwendet.

#### Beispiel 4:

##### Konstruktion der Expressionsplasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2

Aus Teilen der Expressionsplasmide pCDM8 (Seed & Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8573-8577; Seed, Nature 329 (1987) 840-842; Invitrogen Inc., San Diego, CA), pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321 842) und dem Plasmid Bluescript SK+ (Short et al., Nucleic Acids Res., 11 5521-5540; Strategene, La Jolla, CA) wurde ein neues Plasmid konstruiert, das eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen aufweist und sich in E. coli mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren läßt. Die intergenische Region von M13 ermöglicht die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA mittels Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen (z.B. R408 oder M13K07) zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA. Der T7 Promotor, der der Multiklonierstelle vorangeht, ermöglicht die Herstellung von RNA Transkripten in vitro. In Säugetierzellen erfolgt die Expression heterologer Gene getrieben vom Cytomegalovirus (CMV) Promotor/Enhancer (Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530). Der SV40 Replikationsursprung ermöglicht in geeigneten Zelllinien (z.B. SV 40 transformierte Zellen wie COS-7, Adenovirus transformierte Zelllinie 293 (ATCC CRL1573)) die autonome Replikation des Expressionsplasmides zu hohen

Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression. Für die Herstellung permanent transformierter Zelllinien und die nachfolgende Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster-Minigen (Promotor mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker.

a) Herstellung der Vektor- und Promotoranteile durch PCR

Das Plasmid Bluescript SK+ wurde mit HindIII linearisiert und 5 ng DNA in einem 100 µl PCR Ansatz eingesetzt (Reaktionspuffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH=8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% (w/v) Gelatine, 0,2 mM der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 Einheiten Taq Polymerase pro 100 µl). Als Primer wurden je 50 pmol der synthetischen Oligonukleotide EBI-1786 (5'-GGAATTCAGCCTGAA-TGGCGAATGGG-3'; bindet knapp außerhalb von M13 ori-Region in Bluescript Pos. 475, unabhängig von M13 ori-Orientierung) und EBI-1729 (5'-CCTCGAGCGTTGC-TGGCGTTTTTCC-3'; bindet an Bluescript an Pos. 1195 vor ori, entspricht dem Anfang der Bluescript-Sequenz in pCDM8, 6 Basen 5' ergeben XhoI) eingesetzt. Nach 5 Minuten Denaturieren bei 94°C erfolgte die PCR über 20 Zyklen (40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 5 Min bei 72°C, Perkin Elmer Cetus Thermal Cyclor). Die Oligonukleotide flankieren die intergenische Region von M13 bzw. den Replikationsursprung (ori) mit dem dazwischenliegenden Gen für die β-Lactamase. Gleichzeitig wird am Ende des Replikationsursprungs eine XhoI- und am anderen Ende eine EcoRI-Schnittstelle erzeugt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform von Protein befreit und die DNA

mit Ethanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde mit XhoI und EcoRI geschnitten und nach Elektrophorese in einem Agarosegel ein Fragment mit 2,3 kb isoliert.

5 ng mit SacII linearisiertes Plasmid pCDM8 wurden mit den Oligonukleotiden EBI-1733 (5'-GGTCGACATTGA-TTATTGACTAG-3'; bindet an CMV-Promotorregion (Pos. 1542) von pCDM8, entspricht Pos.1 in pAD-CMV, Sall-Stelle für Klonierung) und EBI-1734 (5'-GGAATTCCTAGGAATACAGCGG-3'; bindet an Polyoma origin von 3'SV40 polyA-Region in pCDM8 (Pos. 3590)) unter identischen Bedingungen wie für Bluescript SK+ beschrieben, durch PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide binden am Beginn der CMV-Promotor/Enhancer-Sequenz und erzeugen eine Sall Schnittstelle (EBI-1733) bzw. binden am Ende der SV40 poly-Adenylierungsstelle und erzeugen eine EcoRI Schnittstelle (EBI-1734). Das PCR-Produkt wurde mit Sall und EcoRI geschnitten und ein DNA Fragment von 1,8 kb aus einem Agarosegel isoliert.

Die beiden PCR Produkte wurden mit T4 DNA-Ligase ligiert, mit dem erhaltenen Ligationsprodukt E.coli HB101 transformiert und nach Standardmethoden Plasmid-DNA amplifiziert und präpariert. Das Plasmid der gewünschten Beschaffenheit (siehe Fig.8) wurde pCMV-M13 benannt.

Der SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321842) isoliert. Dazu wurde dieses Plasmid mit HindIII und PvuII doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch nachfolgende Behandlung mit dem großen Fragment der E.coli DNA Polymerase (Klenow Enzym) in Gegenwart der vier Desoxynukleotidtriphosphate stumpf gemacht. Ein dabei erhaltenes 0,36 kb DNA Fragment wurde aus einem

Agarosegel isoliert und in mit EcoRI linearisiertem pCMV-M13 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli HB101 erhaltenes Plasmid mit dem SV40 ori in gleicher Orientierung wie das  $\beta$ -Lactamase Gen und dem CMV-Promotor wurde pCMV-SV40 benannt. Die Konstruktion dieses Plasmids ist in Fig.8 dargestellt.

b) Mutagenese des DHFR-Gens

Zur Herstellung eines Expressionsplasmids mit einer vielseitigen Multiklonierstelle wurden aus dem DHFR Minigen durch gerichtete Mutagenese zwei und durch Deletion drei Restriktionsenzymststellen entfernt. Dazu wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 ein 1,7 kb BglII Fragment, das die gesamte kodierende Region des Hamster DHFR-Gens enthält, in die BglII Stelle des Plasmids pUC219 (IBI) kloniert und das Plasmid pUCDHFR erhalten. Mit pUCDHFR transformierte E.coli JM109 (Stratagene) Zellen wurden mit etwa 40-fachem Überschuß des Helferphagen R408 (Stratagene) infiziert und 16 Stunden bei 37°C in LB-Medium geschüttelt. Aus dem Bakterienüberstand wurde einzelsträngige Plasmid-DNA isoliert.

Die gerichtete Mutagenese erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, wobei das in vitro Mutagenese System RPN1523 (Amersham) verwendet wurde. Die am Beginn von Exon 2 befindliche EcoRI Stelle wurde durch Austausch einer Base von GAATTC zu GAGTTC zerstört. Dieser Basenaustausch führt zu keiner Änderung der kodierten Aminosäuresequenz und entspricht außerdem der Nukleotidsequenz im natürlichen murinen DHFR-Gen (McGrogan et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 2307-2314; Mitchell et al., Mol. Cell. Biol. 6 (1986) 425-440). Für die Mutagenese wurde ein Oligonukleotid (Antisense-Orientierung) der Sequenz 5'-GTACTTGA-

ACTCGTTCCTG-3' (EBI-1751) verwendet. Ein Plasmid mit der gewünschten Mutation wurde, wie oben beschrieben, als Einzelstrang-DNA präpariert und die im ersten Intron befindliche PstI Stelle durch Mutagenese mit dem Oligonukleotid EBI-1857 (Antisense Orientierung, 5'-GGCAAGGGCAGCAGCCGG-3') von CTGCAG in CTGCTG entfernt. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt und das erhaltende Plasmid pUCDHFR-Mut2 benannt. Aus dem Plasmid pUCDHFR-Mut2 wurde das 1,7 kb BglII Fragment isoliert und in mit BglII und BamHI doppelt geschnittenes Plasmid pSV2gptDHFR20 ligiert. Nach Transformation von E.coli, Amplifikation und DNA-Isolierung wurde ein Plasmid der gewünschten Beschaffenheit erhalten, das als pSV2gptDHFR-Mut2 bezeichnet wurde. Durch Schneiden mit BamHI wurde in der 3'-nicht-kodierenden Region des DHFR Gens ein auf die BglII Stelle folgendes 0,12 kb DNA-Fragment entfernt, das außerdem noch eine KpnI Schnittstelle enthält. Durch Verknüpfen der mit BglII und BamHI entstandenen überhängenden DNA-Enden wurden auch die Erkennungssequenzen für diese beiden Enzyme zerstört.

Das Plasmid pCMV-SV40 wurde mit EcoRI und BamHI doppelt geschnitten, die DNA-Enden nachfolgend mit Klenow-Enzym stumpf gemacht. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Ethanol-fällung gereinigt, anschließend durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und die 4,4 kb lange Vektor DNA aus einem Agarosegel isoliert.

Das Plasmid pSV2gptDHFR-Mut2 (Fig.9) wurde mit EcoRI und PstI doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch 20 Minuten Inkubation bei 11°C mit 5 Einheiten T4 DNA-Polymerase (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate, 50 µg/ml

Rinderserumalbumin) stumpf gemacht. Das 2,4 kb lange DNA-Fragment mit dem mutierten DHFR-Gen wurde aus einem Agarosegel isoliert und mit dem wie oben beschrieben präparierten pCMV-SV40 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid, das das DHFR-Gen in derselben Orientierung wie den CMV-Promotor enthielt, wurde pCMV-SV40DHFR benannt. Im letzten Schritt wurde das 0,4 kb "Stuffer"-Fragment nach dem CMV-Promotor, das noch aus dem Ausgangsplasmid pCDM8 stammte, gegen eine Multiklonierstelle ausgetauscht. Dazu wurde das Plasmid pCMV-SV40DHFR mit HindIII und XbaI doppelt geschnitten und der Vektoranteil aus einem Agarosegel isoliert. Die Multiklonierstelle, gebildet aus den beiden Oligonukleotiden EBI-1823 (5'-AGCTTCTGCAGGTCGACATCGATGGATCCGGTACCTCGAGCGGCCGCGAATTCT-3') und EBI-1829 (5'-CTAGAGAATTCGCGGCCGCTCGAGGTACCGGATCCATCGATGTCGACCTGCAGA-3'), enthält inklusive der für die Klonierung in HindIII - XbaI kompatiblen Enden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme PstI, SalI, ClaI, BamHI, KpnI, XhoI, NotI und EcoRI.

Je 1 µg der beiden Oligonukleotide wurden in 20 µl Reaktionspuffer (70 mM Tris-Cl pH=7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM ATP) mit 5 Einheiten T4 Polynukleotidkinase eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die 5'-Enden zu phosphorylieren. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die komplementären Oligonukleotide miteinander hybridisiert, indem die Probe weitere 10 Minuten bei 56°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. 4 µl der hybridisierten Oligonukleotide (100 ng) wurden mit etwa 100 ng Plasmidvektor ligiert und E.coli HB101 transformiert. Ein Plasmid, das sich mit den Enzymen der Multiklonierstelle (ausgenommen NotI) linearisieren ließ, wurde pAD-CMV1 benannt. Von vielen getesteten

Klonen konnte keiner identifiziert werden, dessen Plasmid sich mit NotI schneiden ließ. Die Sequenzierung zeigte immer die Deletion von einigen Basen innerhalb der NotI Erkennungssequenz. In gleicher Weise wurde mit dem Oligonukleotidpaar EBI-1820 (5'-AGCTCTAGAGAATT-CGCGGCCGCTCGAGGTACCGGATCCATCGATGTCGACCTGCAGAAGCTTG-3') und EBI-1821 (5'-CTAGCAAGCTTCTGCAGGTCGACATCGATGGATCCGGTACCTCGAGCGGCCGGAATTCTCTAG-3') das Expressionsplasmid pAD-CMV2 hergestellt, das die Restriktionsschnittstellen innerhalb der Multiklonierstelle in umgekehrter Reihenfolge enthält. Dabei wurde das Plasmid pAD-CMV2 erhalten, das sich mit sämtlichen Restriktionsenzymen, einschließlich NotI, linearisieren ließ.

Die Nukleotidsequenz des 6414 bp großen Plasmids pAD-CMV1 (Fig.10) ist in Fig.11 vollständig dargestellt.

Die Abschnitte auf dem Plasmid (angegeben in der Numerierung der Basen) entsprechen folgenden Sequenzen:

1-21	EBI-1733, Beginn CMV Enhancer - Promotor (aus CDM8)
632-649	T7 Promotor
658-713	Multiklonierstelle (HindIII bis XbaI aus EBI-1823, EBI-1829)
714-1412	SV40 Intron und poly-Adenylierungsstelle (aus CDM8)
1413-2310	5'nicht kodierende Region und Promotor des Hamster DHFR Gens (aus pSV2gptDHFR20)
2311-2396	Hamster DHFR: Exon 1
2516	A zu T Mutation zerstört PstI Stelle in DHFR Intron 1
2701-3178	DHFR Exons 2-6 (kodierende Region)
2707	A zu G Mutation zerstört EcoRI Stelle



3272-3273	Deletion zwischen BglII und BamHI in DHFR 3'nicht kodierender Region
3831	Ende DHFR Gen (aus pSV2gptDHFR20)
3832-4169	SV40 ori (aus pSV2gptDHFR20)
4170-4648	M13 ori (aus pBluescript SK+)
4780-5640	$\beta$ -Lactamase (kodierende Region)
6395-6414	EBI-1729, Ende der pBluescript Vektorsequenz

Die Herstellung der Plasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2 ist in Fig.10 dargestellt.

#### Beispiel 5

Entwicklung von rekombinanten "Chinese hamster ovary (CHO)"-Zelllinien, die glycosyliertes Human-Interferon- $\alpha$ 2 produzieren

##### a) Transfektion von CHO-Zellen und Selektion stabil transfizierter Zelllinien

Die parentalen Zelllinien, CHO-DXB11 und CHO-DG44 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, 1980; Som. Cell. Molec. Genet. 12, 555-666, 1986) wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 supplementiert mit 10% fötalem Rinderserum, Hypoxanthin (100  $\mu$ M), Thymidin (16  $\mu$ M), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml) gezüchtet. Zwei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> - Flaschen angesetzt; zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen nahezu konfluent.

Das Transfektionsexperiment wurde wie folgt durchgeführt. 20  $\mu$ l einer Lösung von Plasmid pAD19B-IFN (1  $\mu$ g/ml) wurden mit 125  $\mu$ l 2 M CaCl<sub>2</sub> und 855  $\mu$ l sterilem deionisiertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu 1 ml 2 x HSB

zugesezt (1 x HSB enthält pro Liter Lösung: 8,18 g NaCl, 5,94 g HEPES, 0,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,1). Das Kulturmedium der CHO-Zellen wurde entfernt, und 0,25 ml der Suspension wurden zu jeder Flasche zugezt; die Kulturen wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde dann entfernt, die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst und in Selektionsmedium suspendiert (das Selektionsmedium bestand aus Minimum Essential Medium, alpha-Modifikation ohne Ribonucleotide and Deoxyribonucleotide, ergänzt mit 10% dialysiertem fötalem Rinder serum, Natrium-Penicillin G 100 Einheiten/ml, Streptomycin 50 Einheiten/ml, and Amphotericin B 2,5 µg/ml; 40 ml pro Flasche). Die Zellsuspension wurde dann in die Vertiefungen von zwei Zellkultur-Mikrotiterplatten transferiert (96 Vertiefungen pro Platte, 0,2 ml pro Vertiefung) und zwei Wochen bei 37°C inkubiert. Das angegebene Selektionsmedium wurde, allerdings ohne Amphotericin B, auch für alle weiteren Experimente verwendet.

Die Zellkulturen wurden visuell auf Zellwachstum überprüft. Kulturmedium aus Vertiefungen, die Zellwachstum zeigten, wurden auf IFN-α2-Gehalt mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays getestet, der zwei monoklonale Antikörper gegen IFN-α2 verwendet (Biochem. J. 276, 511-518, 1991). Dieser Test wurde mit neuen Kulturüberständen eine Woche später wiederholt. Zellen aus positiven Kulturen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst und jeweils in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen transferiert. Kulturen, die gutes Zellwachstum zeigten, wurden dann wiederholt auf IFN-Produktion getestet. Die IFN-α2 - Konzentrationen in den Überständen lagen typischerweise im Bereich zwischen 2.000 und >10.000 Einheiten/ml (1 ng IFN-α2 - Protein entspricht 230 Einheiten).

b) Amplifikation des IFN- $\alpha$ 2 Gens durch  
Methotrexat-Selektion

Transfizierte Klone von beiden Parental-Zelllinien, CHO-DXB11 und CHO-DG44, die in mehreren Tests hohe IFN-Konzentrationen gezeigt hatten, wurden für die Amplifikation ausgewählt; zusätzlich wurden jeweils 3 - 5 weitere Klone vereinigt. Diese Kulturen wurden nun in 25 cm<sup>2</sup> - Flaschen in Selektionsmedium (ohne Amphotericin B) gehalten, dem Methotrexat in Konzentrationen von 20 nM oder 50 nM zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden wöchentlich einmal mit frischem Medium versehen. Überlebende Klone wurden nach etwa 2 - 3 Wochen beobachtet. Sobald die Zellen etwa 50% der Kulturfläche bewachsen hatten, wurden die Überstände wieder auf ihren IFN- $\alpha$ 2 Gehalt getestet. Die Zellen wurden dann abgelöst, verdünnt und in neue Flaschen transferiert. Die Methotrexat-Konzentration wurde nun um den Faktor von etwa 2 - 5 erhöht, z.B. von 20 nM auf 50 und 100 nM, oder von 50 nM auf 100 und 200 nM. Nach mehreren derartigen Selektionszyklen in Gegenwart steigender Mengen an Methotrexat, und Selektion resistenter Kulturen nach ihrer IFN-Produktion, konnten schließlich Zelllinien erhalten werden, die resistent gegen Methotrexat-Konzentrationen bis zu 5.000 nM waren und relativ große Mengen an IFN- $\alpha$ 2 sezernierten. Die folgende Tabelle I illustriert den Anstieg der Produktivität am Beispiel der Zelllinie CHO-DXB11-IFN- $\alpha$ 2c-3/2D4.

Die nachfolgende Tabelle II zeigt die Ergebnisse mit der Zelllinie CHO-DG44-IFN- $\alpha$ 2c-pool"S":

Tabelle I

Methotrexat-Konzentration (nM)	IFN- $\alpha$ 2c in Kulturüberständen (Einheiten/ml)
0	6.000 - 14.000
20	12.000 - 89.000
50	29.000 - 125.000
100	96.000 - 120.000
200	110.000 - 190.000
500	140.000 - 300.000
1000	350.000 - 900.000
2000	200.000 - 350.000
5000	210.000 - 960.000

37

Tabelle II

Methotrexat-Konzentration (nM)	IFN- $\alpha$ 2c in Kulturüberständen (Einheiten/ml)
20	29.000 - 83.000
50	58.000 -112.000
100	69.000 - 98.000
200	71.000 -220.000
500	190.000 -220.000
1000	170.000 -570.000
2000	200.000 -350.000
5000	190.000 -320.000

Aus Kulturüberständen rekombinanter CHO-Zellen konnte IFN- $\alpha$ 2 mit Hilfe von Affinitätschromatographie an monoklonalen Antikörpern (z. B. den Antikörpern EBI-1 oder EBI-10) nach bereits bekannten Methoden gereinigt werden (z.B. Nature 285, 446-450, 1980; J. Biol. Chem. 265, 9290-9295, 1990; Biochem. J. 276, 511-518, 1991). Zur Reinigung der erfindungsgemäßen Proteine eignet sich in besonderer Weise das in der EPA 0 203 382 beschriebene Verfahren.

### Beispiel 6

Charakterisierung von rekombinantem, glycosyliertem humanem IFN- $\alpha$ 2c aus "Chinese hamster ovary (CHO)"-Zellen.

#### a) Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)

Affinitätsgereinigtes rekombinantes glycosyliertes IFN- $\alpha$ 2c aus CHO-Zellen wurde mittels RP-HPLC mit rekombinantem IFN- $\alpha$ 2c aus E.coli, das nicht glycosyliert ist, verglichen. Die genaue Analysenmethode ist in Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Glycosyliertes CHO-IFN- $\alpha$ 2c (oberer Teil von Fig.21) besteht aus zwei Hauptpeaks (Peaks 1 und 2) und zwei kleineren IFN-Peaks (Peaks 3 und 4). Unglycosyliertes E.coli-IFN- $\alpha$ 2c dagegen (unterer Teil von Fig.21) zeigt einen Hauptpeak (korrekte Disulfidbrücken) und einen kleineren Nebenpeak, der von einer Form mit "scrambled" Disulfidbrücken stammt. Aus dem Vergleich der Retentionszeiten sieht man, daß die zwei Hauptpeaks des CHO-IFN- $\alpha$ 2c etwas früher eluieren als der Hauptpeak des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Der Grund für diese verringerte Hydrophobizität ist die Anwesenheit von Oligosacchariden im CHO-IFN- $\alpha$ 2c. Die zwei kleineren IFN-Peaks im CHO-IFN- $\alpha$ 2c haben etwa die gleiche Retentionszeit wie der Hauptpeak des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c und stammen damit höchstwahrscheinlich von einem kleineren unglycosylierten Anteil des CHO-IFN- $\alpha$ 2c.

#### b) N-terminale Sequenzierung

Die zwei Hauptpeaks des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert und gemeinsam sequenziert. Die

Sequenzierungsbedingungen sind in Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Die ersten 15 Aminosäuren konnten in Übereinstimmung mit der cDNA-Sequenz identifiziert werden. Es gab keine Hinweise auf eine Heterogenität am N-Terminus.

### c) C-terminale Analyse

Der Hauptpeak des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c und die zwei Hauptpeaks des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert und mit Trypsin gespalten. Die tryptischen Peptide wurden wieder mittels RP-HPLC getrennt. Die experimentellen Bedingungen sind in Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991) beschrieben. Fig.22 zeigt einen Vergleich der erhaltenen Peptide Maps. Zwischen den Peptide Maps von Peak 1 und Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (oberer und mittlerer Teil) gab es nur einen einzigen Unterschied. Das tryptische Peptid 18 aus Peak 1 ist im Peak 2 (dort als Peptid 15) nahezu nicht vorhanden. Stattdessen wurde ein neues Peptid (Nummer 19) im Map von Peak 2 gefunden, das sowohl im Peak 1 als auch im E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (unterer Teil von Fig.22) überhaupt nicht vorkommt.

Die Peptide 12 (aus E.coli-IFN- $\alpha$ 2c), 18 (aus Peak 1 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c), 15 und 19 (aus Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c) wurden mit Plasmadesorptions-Massenspektrometrie (PD-MS) analysiert. Die experimentellen Details dafür sind in Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991) beschrieben. Für die ersten drei der genannten Proben wurde ein Molekulargewicht gefunden, das den Aminosäuren 150 bis 162 der IFN- $\alpha$ 2c-Sequenz entspricht. Peptid 19 aus Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c ergab dagegen ein geringeres Molekulargewicht, entsprechend den Aminosäuren 150 bis



161. Ein Teil des Peptids 19 wurde auch sequenziert, wobei sich eindeutig zeigte, daß dieses Peptid mit der Aminosäure 150 beginnt und mit LEU-161 endet. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß der Peak 1 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c ein vollständiges IFN-Molekül enthält, während beim Peak 2 die 4 C-terminalen Aminosäuren (162-165) fehlen. Die Aminosäuren 163-165 können in einem Peptide Map nach Trypsinspaltung nicht positiv identifiziert werden, da das daraus resultierende Dipeptid (163/164) und die freie Aminosäure (165) im Totvolumen der RP-Säule eluieren. Der kleine Anteil von Peptid 15 (unverkürztes tryptisches Peptid mit den Aminosäuren 150-162), der auch im Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c gefunden wurde, ist wohl auf einen kontaminierenden Anteil von Peak 1 zurückzuführen, da die Peaks 1 und 2 mittels RP-HPLC nicht vollständig getrennt werden können.

In weiteren Experimenten wurde festgestellt, daß die C-terminale Verkürzung des O-glycosylierten IFN- $\alpha$ 2 aus CHO-Zellen verhindert werden kann, wenn für das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturgefäße an Stelle der üblichen Trypsin/EDTA-Lösung eine trypsinfreie Lösung verwendet wird (z.B. EDTA Dinatriumsalz, 200 mg/L mit D(+)-Glucose Monohydrat, 200 mg/L in phosphatgepufferter Natriumchloridlösung pH 7.4). IFN- $\alpha$ 2, das aus derart kultivierten Zellkulturen nach den oben beschriebenen Verfahren gereinigt wurde, zeigte in der Reverse Phase - HPLC (analog zu Abbildung 21a) nur den Peak 1, der dem vollständigen Protein entspricht, aber nicht den Peak 2, der dem verkürzten Protein entspricht. Weiterhin konnte mit Hilfe der tryptischen Peptide Maps (analog zu Abbildung 22) gezeigt werden, daß das Peptid-Muster dieses ohne Verwendung von Trypsin hergestellten Proteins identisch mit dem Muster der aus dem Peak 1 generierten Peptide (Abbildung 22a) ist.

SDS-Gelelektrophorese

Die Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert. Sie wurden einzeln und im Vergleich zu E.coli-IFN- $\alpha$ 2c sowohl unter reduzierenden (nach Kochen mit Dithiothreitol) als auch unter nichtreduzierenden Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die experimentellen Details sind in Adolf et al., J. Biol. Chem., 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Die Ergebnisse sind in Fig.23 gezeigt (Spuren 2-4 unter nichtreduzierenden Bedingungen, Spuren 5-7 unter reduzierenden Bedingungen; oberer Teil mit 4  $\mu$ g IFN in jeder Spur, unterer Teil mit je 1  $\mu$ g IFN). Speziell aus den Spuren 5-7 des unteren Teils ist ersichtlich, daß sowohl Peak 1 als auch Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c ein höheres Molekulargewicht haben als das unglycosylierte E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Wegen der nicht vollständigen Trennung der Peaks 1 und 2 bei der RP-HPLC ist eine gegenseitige Kontamination der Peaks 1 und 2 vorhanden. Aus demselben Grund ist auch der Peak 2 mit einer geringen Menge von unglycosyliertem CHO-IFN- $\alpha$ 2c, das aus Peak 3 (siehe Fig.21) stammt, kontaminiert. Unter Berücksichtigung dieser Kontaminationen scheinen die Hauptbanden der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c homogen zu sein. Da sich die Peaks 1 und 2 bezüglich des C-Terminus unterscheiden (siehe oben), kann aus den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese geschlossen werden, daß die Oligosaccharid-Anteile der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c identisch sind (siehe auch später in Kapitel f).

e) Deglykosylierung von CHO-IFN- $\alpha$ 2c

Die Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert und in einem SpeedVac Konzentrator getrocknet. Diese Proben sowie E.coli-IFN- $\alpha$ 2c wurden in 10  $\mu$ l 0,1 M NaOH 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch diese  $\beta$ -Elimination deglycosylierten Proben wurden im Vergleich zu unbehandelten Proben mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse in Fig.24 zeigen, daß das Molekulargewicht der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c nach Behandlung mit NaOH deutlich reduziert und identisch mit dem des NaOH-behandelten E.coli-IFN- $\alpha$ 2c ist. Das diffuse Aussehen der Banden aller mit NaOH behandelten Proben ist auf Veränderungen in der Peptidkette unter den angewandten Reaktionsbedingungen zurückzuführen.

f) Identifizierung der Glykopeptide mittels Peptide Mapping

Der Vergleich der Peptide Maps nach Trypsinspaltung von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (Fig.22, unterer Teil) und von Peak 1 (vollständiger C-Terminus) des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (Fig.22, oberer Teil) zeigt, daß jeweils zwei Peptide unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen. Die Peptide 18 und 21 von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c, die die Aminosäuren 84-112 bzw. 71-112 enthalten, kommen im Peptide Map von Peak 1 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c nicht vor. Stattdessen gibt es dort zwei neue Peptide (Nummer 26 und 31), die das gleiche Verhältnis der Absorptionen bei 280 und 214 nm zeigen wie die Peptide 18 und 21 von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Man kann daraus folgern, daß die Peptide 26 und 31 die glycosylierten Versionen der Aminosäuresequenzen 84-112 bzw. 71-112 darstellen.

Daher eluieren sie auch deutlich früher von der RP-Säule als die analogen Peptide von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Für die beiden möglichen Längen der tryptischen Peptide (Aminosäuren 84-112 bzw. 71-112) gibt es jeweils einen Hauptpeak (Peptid 26 bzw. 31), woraus geschlossen werden kann, daß der Oligosaccharid-Anteil weitgehend homogen ist.

Aus dem Vergleich der Peptide Maps der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (oberer und mittlerer Teil von Fig.22) ist ersichtlich, daß die jeweiligen Glycopeptide (26 und 31 aus Peak 1 bzw. 24 und 30 aus Peak 2) identisch sind. Daraus folgt ebenfalls, daß die vier fehlenden Aminosäuren am C-Terminus von Peak 2 den einzigen Unterschied zwischen den Peaks 1 und 2 darstellen.

Alle die Aminosäuresequenzen 84-112 bzw. 71-112 betreffenden Hauptpeptide der drei IFN-Proben wurden von RP-HPLC isoliert und mit Staphylococcus Aureus V8 Protease an der C-terminalen Seite von Glutaminsäure weitergespalten. Die exakten Bedingungen sind in Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991) beschrieben. Die resultierenden Peptide Maps wurden verglichen, alle unterschiedlichen Peaks wurden isoliert und mittels N-terminaler Sequenzierung und/oder Massenspektrometrie weiter analysiert.

Eines der in den Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c, aber nicht in E.coli-IFN- $\alpha$ 2c vorkommenden Staph.A.-Peptide enthielt die Aminosäuren 97-112 der IFN- $\alpha$ 2c-Sequenz. Über die N-terminale Sequenzierung konnte in diesem Peptid THR-106 nicht identifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß THR-106 in diesem Peptid glycosyliert vorliegt. Bei der hier verwendeten Edman-Sequenzierung werden glycosylierte Aminosäuren

derivatisiert und abgespalten wie unglycosylierte Aminosäuren, sie können jedoch wegen ihrer erhöhten Hydrophilizität mit Butylchlorid nicht aus dem Reaktionsgefäß extrahiert werden. Daher kann man in diesem Abbauschritt keinerlei Aminosäure identifizieren, die Sequenz geht jedoch danach völlig ungestört weiter. Ein weiterer Hinweis darauf, daß das Oligosaccharid an THR-106 gebunden ist, ergab sich aus dem Resultat, daß die GLU-107/THR-108-Bindung durch die Staph.A.-Protease nur teilweise gespalten wurde. Offensichtlich ist die Zugänglichkeit dieser Peptidbindung durch die Anwesenheit des Oligosaccharids eingeschränkt. In dem analogen Peptid aus E.coli-IFN- $\alpha$ 2c wird diese Peptidbindung nahezu vollständig gespalten.

Ein weiteres Staph.A.-Peptid, das nur in CHO-IFN- $\alpha$ 2c vorkommt, wurde mittels Plasmadesorptions-Massenspektrometrie analysiert. Das erhaltene Molekulargewicht entsprach den Aminosäuren 97-112 inklusive einem Oligosaccharid, bestehend aus je einem Molekül N-Acetylgalactosamin und Galactose sowie zwei Molekülen N-Acetylneuraminsäure.

Aus diesen Resultaten ist ersichtlich, daß sowohl die Glycosylierungsstelle als auch der Oligosaccharidanteil des CHO-IFN- $\alpha$ 2c weitgehend identisch sind mit den in natürlichem IFN- $\alpha$ 2 aus virusstimulierten Leukocyten gefundenen Verhältnissen.

Isolierung des O-glycosylierten Interferons aus virusstimulierten Zellen:

## Methoden

Interferon Bioassay: Die antivirale Aktivität der IFN Präparationen wurde in einem Assay, der den cytopathischen Effekt (CPE) von Enzephalomyocarditis Virus (EMCV) mißt, in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Testzellen werden die A549 humanen Lungencarcinomzellen verwendet. Details dieses Assays sind beschrieben worden (z.B. Adolf, G.R., J.Gen.Virol. 68, 1669-1676 (1987)). Bei jedem Bioassay wurden alle Titrations zweimal durchgeführt. Eine Laborstandard-Präparation an rekombinantem in E. coli produziertem humanem IFN- $\alpha$ 2c wurde in jedem Assay mitgeführt: die Aktivität dieser Präparation wurde kürzlich durch Vergleich mit der internationalen Referenzpräparation für human IFN- $\alpha$ 2, Gxa 01-901-535 ermittelt. Alle beobachteten IFN-Aktivitäten wurden korrigiert im Hinblick auf die definiert Wirksamkeit dieser Referenzpräparation.

Interferon ELISA: Ein ELISA wurde etabliert, der zwei neutralisierende murine IgG MAbs für IFN- $\alpha$  und eine IFN- $\alpha$ 2c Laborreferenzpräparation (s. oben) als Standard verwendet. Die Herstellung der Antikörper und ihre Eigenschaften sind beschrieben (Adolf et al. J. Cell Physiol. suppl. 2, 61-68 (1982); Adolf G.R. J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987)). Der Antikörper EBI-1 wurde zur Beschichtung der Assay Platten verwendet; der Antikörper EBI-10, kovalent gekoppelt an Meerrettich Peroxidase, wurde mit der zu untersuchenden Probe zugegeben. O-Phenylendiamin und Natriumperborat wurden als Substrate für das Enzym verwendet; die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure unterbrochen und die Absorption des resultierenden Produktes gemessen (492 nm, Referenz 690 nm).

Reinigung des natürlichen human IFN- $\alpha$ 2:

Eine Affinitätssäule wurde durch Kopplung von 12 mg des monoklonalen Antikörpers, beispielsweise des MAb EBI-10 (gereinigt aus dem Maus-Ascites durch Ammoniumsulfat Präzipitation und Protein G Affinitätschromatographie nach Standardmethoden) an Ig CNBr-aktivierter Sepharose 4B nach den Empfehlungen des Herstellers (Pharmacia) hergestellt. Das endgültige Bettvolumen der Säule betrug annähernd 3 ml. Teilweise gereinigtes human Leukozyteninterferon (Cantell et al. Methods Enzymol. 78, 29-38 (1981); Cantell et al. ibid. 499-505) bei dem der IFN- $\omega$  Anteil entfernt worden war (Adolf et al. J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990)) und das etwa  $2-3 \times 10^6$  IU/ml mit einer totalen Protein Konzentration von 2 mg/ml enthielt, wurde mit einer Durchflußrate von 1 ml/Min auf die Säule aufgetragen (200 und 350 ml). Die Säule wurde dann mit 0,1 M Natriumphosphat Puffer pH 7,5 (Puffer A) gewaschen und mit einem Lineargradienten aus Puffer A und Puffer B (0,1 M Natriumcitrat pH 2,1) in einem FPLC-System (Pharmacia) bei einer Durchflußrate von 1 ml/Min eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf IFN-Aktivität mit Hilfe des ELISA geprüft. Entsprechende Fraktionen beider Ansätze wurden gesammelt, mit 1 M NaOH neutralisiert und erneut auf dieselbe Säule aufgetragen, die mit Puffer A reäquilibriert worden war. Dasselbe Elutionsprogramm wurde verwendet. (Durchflußrate 0,25 ml/Min) Entsprechende Fraktionen wurden wieder gesammelt, neutralisiert und in Aliquots eingefroren.

SDS Gelelektrophorese, HPLC-Techniken und Aminosäuresequenzierungen: SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Reverse Phase HPLC wurden

verwendet um das gereinigte IFN- $\alpha$ 2 zu analysieren; sämtliche Methoden sind ausführlich beschrieben worden (Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990)). Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz wurde in einem automatischen Sequenator (Applied Biosystems, Modell 477A) durchgeführt; Aminosäurederivate wurden on-line durch RP-HPLC analysiert (Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990)).

"Mapping" der proteolytischen Peptide:

Affinitätsgereinigtes IFN- $\alpha$ 2 wurde weiterhin durch Reverse Phase HPLC gereinigt, denaturiert und entsalzt wie bei Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Die Peakfraktionen wurden gesammelt und in einem SpeedVac Konzentrierer getrocknet. 29  $\mu$ g (Peak 1) und 66  $\mu$ g (Peak 2) Protein wurden in 0,1 ml 1%iger Ammoniumbicarbonatlösung aufgelöst; 0,5 bzw. 1  $\mu$ g Trypsin (Boehringer Mannheim) in 3 bzw. 6  $\mu$ l 0,01 %iger Trifluoressigsäure wurden zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 37°C inkubiert. Nach 6 h Inkubationszeit wurde dieselbe Menge Trypsin erneut zugegeben und für weitere 18 h inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde vor der Analyse durch Zugabe von 10  $\mu$ l 0,5 M Dithiothreitol und 100  $\mu$ l 6 M Harnstoff 2 h bei Raumtemperatur reduziert. Reverse Phase HPLC wurde auf einer Delta Pak C18 Säule (Waters; 3,9 x 150 mm; Teilchengröße 5  $\mu$ m; Porendurchmesser 100Å) bei 30°C unter Verwendung folgender Lösungsmittel durchgeführt: Lösungsmittel A: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser; Lösungsmittel B: 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril. Das folgende Gradientenprogramm wurde verwendet (Durchflußrate 1 ml/Min): 0-55 Min: 0-55 % B (linearer Gradient); 55-70 Min: 50 % B. Detektiert wurden die Peptide durch ihre Absorption bei 214 und 280 nm. Die resultierenden



Muster wurden mit denen des rekombinanten aus *E. coli* stammenden IFN- $\alpha$ 2c verglichen. Die Peptide des natürlichen IFN- $\alpha$ 2, die sich in ihrem Elutionsverhalten anders verhielten als ihre rekombinanten Gegenstücke wurden gesammelt und N-terminal sequenziert oder wurden mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease weiter abgebaut (Endopeptidase Glu-C, Boehringer Mannheim). 0,88  $\mu$ g (Peak 1/I), 2,6  $\mu$ g (Peak 2/Ia) und 1,5  $\mu$ g (Peak 2/Ib) der Peptide wurden jeweils in 0,1 ml 25 mM Phosphatpuffer pH 7,8 gelöst. In Wasser gelöste Protease wurde zugegeben (17,5 ng, 52,5 ng bzw. 29 ng) und die Reaktionsmischung wurde bei 37°C inkubiert. Nach 6 h wurden dieselben Mengen Protease erneut zugegeben und 18 h inkubiert. Die Proben wurden daraufhin einer Reverse Phase HPLC Analyse unterzogen (s. oben). Entsprechende Fraktionen -- wurden gesammelt und N-terminal sequenziert.

Deglykosylierung des IFN- $\alpha$ 2: Gereinigtes, denaturiertes und entsalztes IFN- $\alpha$ 2 wurde mit *Vibrio cholerae* Neuraminidase (Boehringer Mannheim) (50 mU/ml, 18 h bei 37°C in 20  $\mu$ l 50 mM Natriumacetat pH 5,5, 4 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und/oder Endo- $\alpha$ -N-acetyl-galactosaminidase -ist gleich O-Glycanase- (Boehringer Mannheim) (100 mU/ml, 18 h bei 37°C im selben Puffer) behandelt. Chemische Eliminierung wurde durch Inkubation in 0,1 M NaOH 20 h bei Raumtemperatur erreicht.

Plasmadesorptions-Massenspektrometrie:

Massenspektren der tryptischen Peptide wurden auf einem "BIO-ION 20 time-of-flight" Massenspektrometer (BIO-ION Nordic AB, Uppsala, Schweden) gemessen. Die Proben wurden in wäßriger Trifluoressigsäure (0,1 %) gelöst und auf Nitrozellulose-beschichtete Targets aufgebracht (BIO-ION). Die spektralen Akkumulationszeiten bewegten

sich zwischen 0,5 und 12 h, abhängig von der Ausbeute. Die Spektren wurden gemessen bei einer Beschleunigungsspannung von 17 kV.

Beispiel 7:

#### Reinigung des natürlichen human IFN- $\alpha$ 2

Humanes Leukozyten-Interferon, erhalten aus Sendai Virus induzierten humanen peripheren Leukozyten und teilweise gereinigt nach dem Reinigungsverfahren von Cantell et al. (Methods Enzymol 78, 29-38 und 78, 499-512 (1981)), wurde als Ausgangsmaterial für die Isolierung und Reinigung des IFN- $\alpha$ 2 verwendet. Durch selektive Affinitätschromatographie mit Anti IFN- $\omega$  monoklonalen Antikörper, beispielsweise OMG-4, OMG-5 oder OMG-7 war der Anteil an IFN- $\omega$  entfernt worden (Adolf et al. Virology 175, 410-417 (1990); EPA 262 571). Die spezifische antivirale Aktivität betrug  $1-2 \times 10^6$  IU/mg; IFN- $\alpha$ , mit einer spezifischen Aktivität von  $2 \times 10^8$  IU/mg war demnach nur mit etwa 1% des gesamten Proteinanteils vertreten. Zur Reinigung des IFN- $\alpha$ 2 von kontaminierenden Fremdproteinen und gleichzeitig von anderen IFN- $\alpha$  Spezies wurden hoch selektive Anti IFN- $\alpha$ 2 monoklonale Antikörper verwendet. Diese Antikörper besitzen in standardisierten Neutralisations-Bioassays hohe Spezifität für das IFN- $\alpha$ 2 (Adolf G.R. J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987)).

Eine Immunoaffinitätssäule wurde hergestellt, indem ein solcher monoklonaler Antikörper, beispielsweise der EBI-10 hergestellt z.B. gemäß J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987) oder DE 33 06 060.6 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt wurde. Der Antikörper war aus dem Maus-Ascites durch Ammoniumsulfat Präzipitation und

Protein G Affinitätschromatographie nach Standardverfahrensweisen gereinigt worden. Verwendet wurden beispielsweise 12 mg des monoklonalen Antikörpers EBI-10, die an Ig CNBr-aktivierter Sepharose 4B gekoppelt wurden, wobei die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingehalten wurden (Pharmacia). Das endgültige Bettvolumen der Säule betrug etwa 3 ml.

Die Leukozyten-Interferon Präparation wurde auf die Säule aufgetragen; ungefähr 20% der antiviralen Aktivität wurden gebunden. Die Säule wurde mit einem linearen Puffergradienten aus 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,5 und 0,1 M Natriumcitrat pH 2,1 eluiert. Zwei Proteinpeaks konnten im Eluat festgestellt werden (Fig. 12): Fraktion A und Fraktion B. Beide Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an IFN- $\alpha$  analysiert, wobei ein "zwei-Seiten ELISA" verwendet wurde, bei dem sowohl EBI-10 als auch EBI-1 verwendet wurde. Beide Antikörper zeigen hohe Spezifität für IFN- $\alpha$ 2 (Adolf et al. J. Cell Physiol. suppl. 2, 61-68 (1982)). Rekombinantes IFN- $\alpha$ 2c wurde als Standard verwendet. Die Fraktion, die bei niedrigem pH eluiert worden war (Fig. 12, Peak "A"), ebenso wie die Probe ergaben Titrationskurven, die parallel zu der Titrationskurve des rekombinanten IFN- $\alpha$ 2c verliefen. Der Durchlauf und Fraktionen des 1. Peaks ("B") ergaben Kurven mit verschiedenen Steigungen; sie konnten daher nicht durch den ELISA quantifiziert werden (Fig. 13), sondern wurden im biologischen Assay überprüft (Tabelle III).

Der niedrige, zur Elution des Peak "A" erforderliche pH, ebenso wie die Ergebnisse des ELISA deuteten darauf hin, daß IFN- $\alpha$ 2 ein Hauptbestandteil des Peak "A" war. Um sicherzustellen, daß sämtliches immunreaktives IFN- $\alpha$  durch den Antikörper gebunden worden war, wurde der Durchlauf erneut über die Säule gegeben und wie

oben beschrieben ein zweites Mal eluiert. Das eluierte Material ergab weniger als 10% der IFN-Aktivität, die beim ersten Durchlauf gebunden worden war.

Sowohl die Fraktionen "A" als auch "B" wurden getrennt gesammelt, neutralisiert und erneut einer chromatographischen Reinigung auf derselben Affinitätssäule unterzogen. In beiden Fällen wurde mehr als 95% der IFN-Aktivität gebunden; Elution erfolgte an derselben Gradientenposition wie im ersten Zyklus. Ausgangsprodukt, Durchlauf und die gesammelten Fraktionen beider Chromatographien wurden durch Coomassie Blau Färbungsassays auf ihren Proteingehalt und durch einen antiviralen Bioassay auf ihren IFN-Aktivitätsgehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt:

Tabelle III

Reinigung des natürlichen IFN- $\alpha$ 2

	Volumen ml	Protein mg/ml	antivirale Aktivität $\times 10^{-6}$		Ausbeute %
			IU/ml <sup>1</sup>	IU total	
P-IF <sup>2</sup>	550	1,7	2,8	1540	100
1. Zyklus					
Durchfluß	550	1,7	2,2	1216	79
1. Zyklus					
Eluat A	18	0,08	9,6	172	11
1. Zyklus					
Eluat B	17	0,05	4,3	73	4,8
2. Zyklus					
Eluat A	8	0,1	12	96	6,2
2. Zyklus					
Eluat B	4	0,1	13	54	3,5

<sup>1</sup> Mittelwert von 5 verschiedenen Bioassays

<sup>2</sup> teilweise gereinigtes humanes Leukocyten IFN nach Entfernung des IFN- $\omega$ 1

## Beispiel 8:

Identifizierung des Affinitäts-gereinigten Proteins als IFN- $\alpha$ 2

Das Affinitäts-gereinigte IFN- $\alpha$  wurde zunächst durch Reverse Phase HPLC analysiert und gereinigt. Peak "A" zeigte zwei unvollständig aufgelöste Peaks "1" und "2" mit einem Massenverhältnis von etwa 1:2 (Fig. 14 unten); Peak "1" repräsentierte eine mehr hydrophile Proteinfraction. Beide Peakfraktionen wurden gesammelt, rechromatographiert und einer N-terminalen Aminosäureanalyse unterzogen. Die nachfolgende Sequenz wurde aus beiden Fraktionen erhalten (die Cys-Reste in Klammern wurden nicht identifiziert, sondern auf der Basis der konservierten IFN-Sequenzen abgeleitet):

[<sup>1</sup>CYS]-ASP-LEU-PRO-<sup>5</sup>GLN-THR-HIS-SER-LEU-<sup>10</sup>GLY-SER-  
ARG-ARG-THR-<sup>15</sup>LEU-MET-LEU-LEU-ALA-<sup>20</sup>GLN-MET-ARG-  
<sup>23</sup>ARG-ILE-<sup>25</sup>SER-LEU-PHE-SER-[CYS]-<sup>30</sup>LEU-

Durch Vergleich mit publizierten Sequenzen wurden beide als IFN- $\alpha$ 2 identifiziert.

In beiden Peakfraktionen "1" und "2" wurde die Aminosäure an Position 23 eindeutig als Arginin identifiziert; die als LeIFA bezeichnete Variante, die an Position 23 Lysin aufweist (Goeddel et al., Nature, 290, 20-26 (1981)), war demnach in der verwendeten Leukozytenpräparation in nachweisbaren Mengen nicht vorhanden. Die Aminosäure an Position 34 wurde als Histidin identifiziert; das isolierte IFN- $\alpha$ 2 war demnach die Variante IFN- $\alpha$ 2b.

Die spezifische antivirale Aktivität des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 bezogen auf die internationale Referenzpräparation für IFN- $\alpha$ 2, Gxa01-901-535, basierend auf einer Bestimmung des Proteingehaltes der Probe durch dessen Absorption bei 214 nm (Adolf et al., Virology 175, 410-417 (1990), wurde zu  $1,5 \times 10^8$  IU/mg bestimmt (Mittelwert aus fünf unabhängigen Bioassays).

Bei einem Vergleich der Retentionszeiten des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 auf der Reverse Phase HPLC mit der des rekombinanten E. coli IFN- $\alpha$ 2c wurde offensichtlich, daß das rekombinante Protein signifikant später eluiert wurde (Fig. 14). Die erhöhte Hydrophilizität des natürlichen Proteins ebenso wie dessen Heterogenität muß daher mit posttranslationalen Modifikationen zusammenhängen.

Reverse Phase HPLC des Elutionspeaks "B" ergab ein kompliziertes Muster von fünf unvollständig aufgelösten Peaks. Sequenzanalysen ergaben, daß sämtliche Peaks IFN- $\alpha$  Spezies darstellten, keiner jedoch IFN- $\alpha$ 2 repräsentierte.

Das durch HPLCgereinigte IFN- $\alpha$ 2 wurde weiterhin durch SDS-PAGE nach Reduktion mit Dithiothreitol analysiert (Fig. 20). Unter den gewählten Bedingungen zeigte das rekombinante IFN- $\alpha$ 2c von E. coli ein scheinbares Molekulargewicht von 17.500 D (Molekulargewicht ausgehend von der Aminosäuresequenz: 19.287 D). HPLC-Peakfraktion "1" gab ein einziges relativ breites Band (scheinbares Molekulargewicht 20.000 D) während Peakfraktion "2" in zwei Hauptkomponenten (20.000 bzw. 19.000 D) und in eine Nebekomponente (21.000 D) aufgespalten wurde. Diese Molekulargewichtsunterschiede im Vergleich zum

rekombinanten Protein aus E. coli, die GröBenheterogenität wie auch die erhöhte Hydrophilizität deuten darauf hin, daß das natürliche IFN- $\alpha$ 2 glycosyliert ist. Da keine Erkennungsstelle für eine N-Glycosylierung in der IFN- $\alpha$ 2 Struktur vorhanden ist, muß O-Glycosylierung vorliegen.

Beispiel 9:

Reaktion von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 mit Endo- und Exoglycosidasen

Die folgenden Versuche wurden jeweils mit beiden Peaks nach Trennung über RP-HPLC (Peaks 1 und 2 aus Fig. 14b) durchgeführt. Beide Proben wurden mit Neuraminidase und anschließend mit O-Glycanase inkubiert. Nach jeder Enzymreaktion wurde ein Aliquot mittels SDS-PAGE untersucht.

Wie in Fig. 16 zu sehen ist, reagierte Peak 1 weder mit Neuraminidase noch mit O-Glycanase. Die scheinbare molekulare Masse blieb mit 20.000 konstant. Die drei Banden des Peaks 2 hingegen reagierten sowohl mit Neuraminidase als auch anschließend mit O-Glycanase. Die Reaktion mit Neuraminidase bewirkte eine Reduktion der scheinbaren molekularen Masse der beiden schwereren Banden ( $M_r$  21.000 und 20.000) auf 19.000. Spuren der Bande mit der scheinbaren molekularen Masse von 20.000 blieben jedoch zurück. Anschließende Inkubation des Proteins mit O-Glycanase führte zu einer weiteren Reduktion der scheinbaren molekularen Masse von 19.000 auf 17.500 (= scheinbare molekulare Masse von E. coli-IFN- $\alpha$ 2c). Die Komponente mit  $M_r$  19.000 wurde dabei vollständig abgebaut. Nach wie vor blieben geringe Mengen der Bande mit der scheinbaren molekularen Masse von 20.000 detektierbar. Da die



Trennung der beiden Peaks 1 und 2 aus Fig. 14b mittels RP-HPLC nicht vollständig war, ist der nicht spaltbare Anteil der Bande mit Mr 20.000 wahrscheinlich auf eine Verunreinigung des Peaks 2 mit Peak 1 zurückzuführen.

In einem weiteren Versuch wurde Peak 2 mit O-Glycanase inkubiert, ohne zuvor mit Neuraminidase behandelt worden zu sein (O-Glycanase spaltet das Disaccharid Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc nur dann vom Protein ab, wenn dieses durch keine weiteren Verbindungen substituiert ist). Das Reaktionsprodukt wurde wieder mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Fig. 17). Man erkennt hier deutlich, daß nur die leichteste Komponente des Peaks 2 eine Reduktion ihrer molekularen Masse erfährt (Reduktion von Mr 19.000 auf Mr 17.500). Die scheinbaren molekularen Massen der beiden schwereren Komponenten (Mr 21.000 und 20.000) blieben unverändert.

#### Beispiel 10:

##### Reaktion von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 mit 0.1 M NaOH

Da O-Glycosylierungen schon unter milden alkalischen Bedingungen abbaubar sind, wurde versucht, die O-Glycanase-resistente Komponente (Peak 1 aus Fig. 14b) mittels Inkubation mit 0,1 M NaOH zu deglycosylieren. Die Reaktion erfolgte wie oben beschrieben. Gleichzeitig wurde als Kontrolle E. coli-IFN- $\alpha$ 2c und Peak 2 unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Wie in Fig. 18 ersichtlich ist, wurden die molekularen Massen aller Komponenten von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 auf die scheinbare molekulare Masse von E. coli-IFN- $\alpha$ 2 reduziert. Die Unschärfe der Proteinbanden ist auf die unter den geschilderten Bedingungen geringfügigen Zerstörungen des Proteins zurückzuführen. Auch die

Banden im höhermolekularen Bereich ( $M_r > 30.000$ ) traten als Folge der alkalischen Behandlung auf.

Beispiel 11:

Identifizierung der Glycopeptide mittels Peptide Mapping

Die beiden Peaks von natürlichem IFN- $\alpha 2$  (Fig. 14b) sowie E. coli-IFN- $\alpha 2c$  wurden mit Trypsin gespalten, reduziert und über RP-HPLC aufgetrennt. In Fig. 19 sind Ausschnitte der Chromatogramme zu sehen. Zwei Peaks aus dem Peptide Map von E. coli-IFN- $\alpha 2c$  fallen dabei wegen ihrer Hydrophobizität (und daher relativ späteren Elution) gegenüber den analogen Peaks aus dem natürlichen IFN- $\alpha 2$  auf: Peak I und Peak II (im Peptide Map des E. coli-IFN- $\alpha 2c$ ) wurden deutlich später eluiert als ihre korrespondierenden Peaks 1/I und 1/II vom Peak 1 aus Fig. 14b bzw. Peaks 2/Ia, 2/Ib, 2/IIa und 2/Iib vom Peak 2 aus Fig. 14b.

N-terminale Sequenzierung der erwähnten Peaks von natürlichem IFN- $\alpha 2$  sowie der beiden E. coli-Peaks ergab für die Peaks I, 1/I, 2/Ia, 2/Ib (aus Fig. 19) die Sequenz des Peptides von Aminosäure (AS) 84-112 und für die Peaks II, 1/II, 2/IIa, 2/Iib die Sequenz von AS 71-112 (Die Aminosäuresequenz von IFN- $\alpha 2c$  ist in Fig. 15 dargestellt). Die unterschiedlichen Retentionszeiten mußten also auf eine Glycosylierung der Peptide aus natürlichem IFN- $\alpha 2$  zurückzuführen sein.

Beispiel 12:

Plasmadesorptions Massenspektrometrie der Glycopeptide von natürlichem IFN- $\alpha 2$

Die Peaks 1/II, 2/Ia, 2/IIa und 2/Iib wurden weiterhin

mit Hilfe von PD-MS charakterisiert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle IV zusammengefaßt. Die Differenz der aus der Aminosäure-Sequenz errechneten molekularen Massen und den tatsächlich erhaltenen molekularen Massen der einzelnen Peptide lassen sich mit unterschiedlichen Glycanstrukturen erklären: Die molekulare Masse des Peptides 1/II, das von der O-Glycanase-resistenten Form des IFN- $\alpha$ 2 erhalten wurde, entspricht der molekularen Masse des Peptides (AS 71-112), das mit einem Tetrasaccharid, bestehend aus zwei N-Acetylhexosamineinheiten und zwei Hexoseeinheiten, substituiert ist. In Analogie zu bereits beschriebenen Strukturen solcher O-Glycane dürfte es sich hier um ein Oligosaccharid mit folgender Struktur handeln :  $\text{Gall-3(Gall-4GlcNAc1-6)GalNAc-}$ .

Peptid 2/Ia wies eine molekulare Masse von 3.975 amu auf, was mit der Substitution des Peptides mit dem Trisaccharid NeuAc-Gal-GalNAc erklärbar ist. Dieselbe Glycanstruktur läßt sich aus der molekularen Masse des Peptides 2/IIa (5.448 amu) ableiten. Für Peptid 2/IIb wurde ein Wert von 5.132 amu gemessen, was einer Glycosylierung mit dem Disaccharid Gal-GalNAc entspricht.

Prinzipiell wiesen alle analysierten Peaks eine um ca. 23 amu erhöhte molekulare Masse auf. Das ist durch Anlagerung von  $\text{Na}^+$ -Ionen an das Peptid erklärbar. Diese Verunreinigungen hätten durch intensives Waschen der Targets vor der Messung vermieden werden können, wurden aber im speziellen Fall in Kauf genommen um Verluste der Glycopeptide gering zu halten. Aus den Ergebnissen des Glycosidase-Abbaues (s. oben) und den massenspektrometrischen Messungen können die in Tabelle IV angeführten Glycanstrukturen abgeleitet werden. Die kleinen Peaks, die im Bereich der Glycopeptide im Peptide Map zu sehen sind, können von weiteren Glycosylierungsvarianten stammen.

60

Tabelle IV

Peak <sup>1</sup>	Peptid (Amino- säure- nummer)	Molekulare Masse (amu) <sup>2</sup>	Vorgeschlagene Glycan- struktur	Masse <sup>3</sup>	
		gem.	ber. Diff. (aus AS- Sequenz)	Struktur	
1/II	71-112	5.485	4.736 749	-GalNAC-Gal	752
				GlcNAC-Gal	
2/Ia	84-112	3.975	3.304 671	-GalNAC-Gal-NeuAc	678
2/IIa	71-112	5.448	4.736 712	-GalNAC-Gal-NeuAc	678
2/IIb	71-112	5.132	4.736 396	-GalNAC-Gal	387

Tabelle IV : Molekulare Massen einiger Glycopeptide von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 mit den entsprechenden vorgeschlagenen Glycanstrukturen. (1) Peaknummern entsprechend Fig. 19; (2) amu, atomare Masseneinheit; (3) berechnete Masse inklusive eines Na<sup>+</sup>-Ions

Beispiel 13:

Identifizierung der O-glycosylierten Aminosäure mittels  
Gasphasensequenzierung

Da die durch Spaltung mit Trypsin erhaltenen Glycopeptide zu lang waren, um ihre gesamte Sequenz zu bestimmen, wurden diese Peptide mittels *Staphylococcus aureus* Protease V8 weiter gespalten und über RP-HPLC aufgetrennt. Mit dem entsprechenden Peptiden aus *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c wurde ebenso verfahren. Nach Vergleich der Peptide Maps wurden alle Peptide mit unterschiedlicher Retentionszeit isoliert und sequenziert. Alle Glykopeptide aus natürlichen IFN- $\alpha$ 2 enthielten die Aminosäuren 97-112. Während im *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c-Peptid  $^{106}\text{THR}$  nachgewiesen werden konnte, war es in den Peptiden aus natürlichem IFN- $\alpha$ 2 nicht nachweisbar. Damit konnte  $^{106}\text{THR}$  als Glycosylierungsstelle identifiziert werden.

## Patentansprüche

1. Interferon alpha, dadurch gekennzeichnet, daß es O-glycosyliert ist und im wesentlichen die biologischen und/oder immunologischen Eigenschaften eines IFN- $\alpha$ 2 aufweist, vorzugsweise daß es das O-glycosylierte humane IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b oder IFN- $\alpha$ 2c ist.
2. Interferon alpha gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Threonin-106 (THR-106) O-glycosyliert ist.
3. Interferon alpha gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligosaccharid bevorzugt das neutrale Disaccharid Gal-GalNAc, dessen mono- oder disialylierte Variante oder das neutrale Tetrasaccharid Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc ist.
4. Verfahren zur Herstellung eines Interferon alpha gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) Leukozyten, vorzugsweise humane Leukozyten mit Virus induziert werden,
  - b) daß das induzierte Interferon alpha durch eine Kaskade schonender, proteinfällender/ proteinlösender Schritte gereinigt wird, wobei der pH den Wert 8,0 nicht überschreiten soll ("Cantell"-Verfahren),
  - c) daß die nach a) oder a) und b) erhaltene Interferonmischung an eine Immunoaffinitätssäule mit einem Anti-IFN- $\alpha$ 2 monoklonalen Antikörper gebunden wird,

- d) daß das gebundene Protein durch geeignete Maßnahmen eluiert wird,
  - e) daß das eluierte Protein gesammelt und gegebenenfalls mehrmals über eine Immunoaffinitätssäule gereinigt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Anti-IFN- $\alpha$ 2 monoklonaler Antikörper der EBI-10 oder dessen Analoga verwendet wird.
6. Verfahren zur Herstellung eines Interferon alpha gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Stufe e) eine weitere chromatographische Reinigung anschließt.
7. Verfahren zur Herstellung eines Interferon alpha gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) in ein für die Transfektion von Zellen multizellulärer Organismen geeignetes Expressionsplasmid eine für IFN- $\alpha$  kodierende DNA eingefügt wird,
  - b) daß mit dem so erhaltenen Expressionsplasmid Zellen multizellulärer Organismen, vorzugsweise Wirbeltierzellen transfiziert werden,
  - c) daß die transfizierten Organismen in einem geeigneten Medium kultiviert werden,

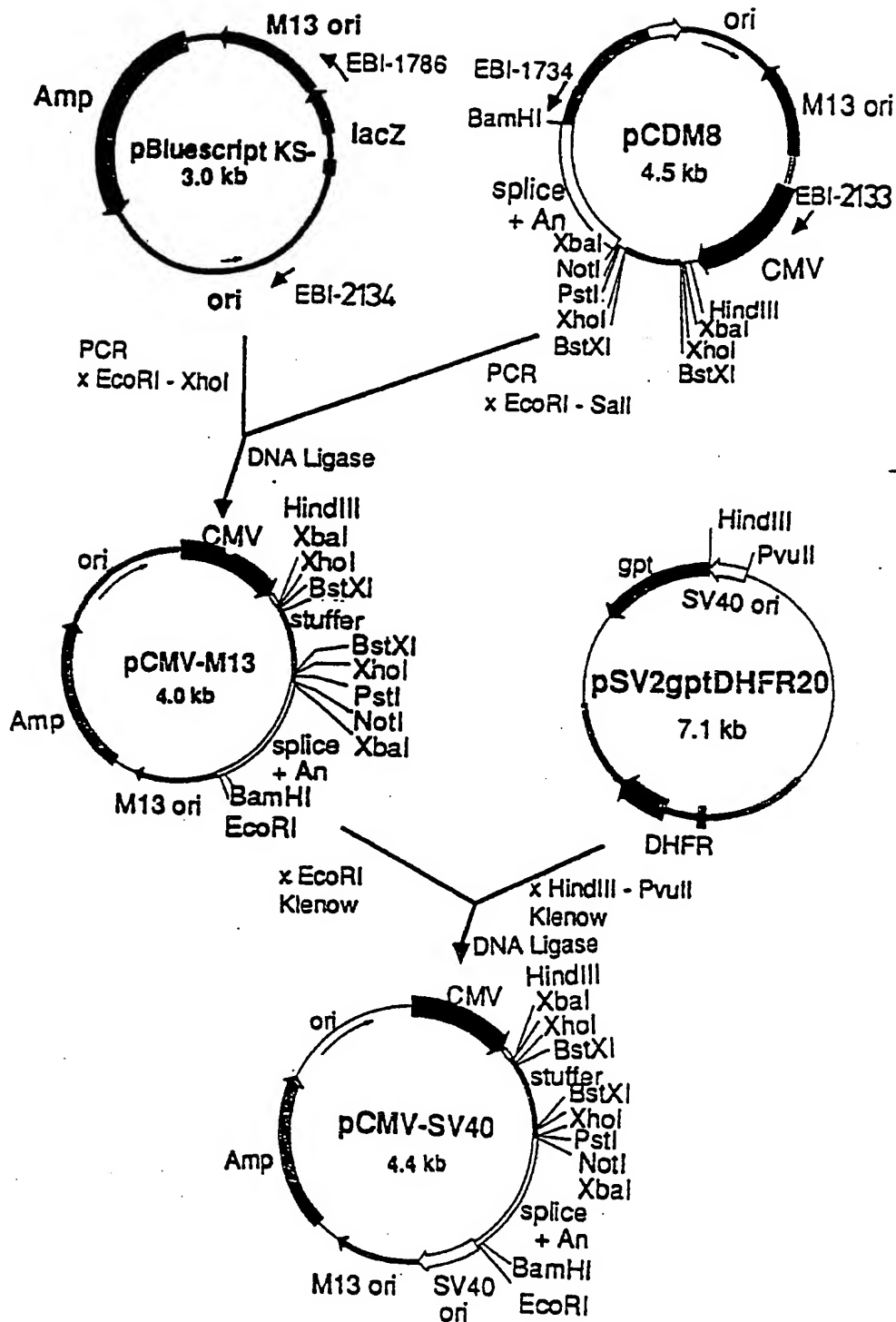
- d) daß der Zellüberstand geerntet,
  - e) daß das O-glycosylierte IFN- $\alpha$  isoliert und in an sich bekannter Weise gereinigt wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das unter a) eingesetzte Expressionsplasmid das pAD-CMV13, 15 oder 19 vorzugsweise das pAD-CMV19 ist, und daß die unter a) einzufügende DNA für ein Protein kodiert, das im wesentlichen die biologischen und/oder immunologischen Eigenschaften eines IFN- $\alpha$ 2 aufweist, vorzugsweise für ein humanes IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b oder IFN- $\alpha$ 2c, insbesondere für humanes IFN- $\alpha$ 2c kodiert.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Expressionsplasmid pAD19B-IFN eingesetzt wird.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Zellen multizellulärer Organismen CHO-Zellen verwendet werden.
11. Expressionsplasmid zur Transfektion multizellulärer Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß es pAD-CMV13, pAD-CMV15 oder pAD-CMV19 ist.
12. O-glycosyliertes Interferon alpha, herstellbar nach einem der Ansprüche 4 bis 10.
13. Interferon alpha gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 12 zur Verwendung als Arzneimittel.



14. Mittel zur Behandlung viraler oder tumoraler Erkrankungen, ein Interferon alpha gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 12 enthaltend.
15. Mittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einer Mischung aus mindestens zwei der O-glycosylierten Proteine IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b oder IFN- $\alpha$ 2c besteht.

1/32

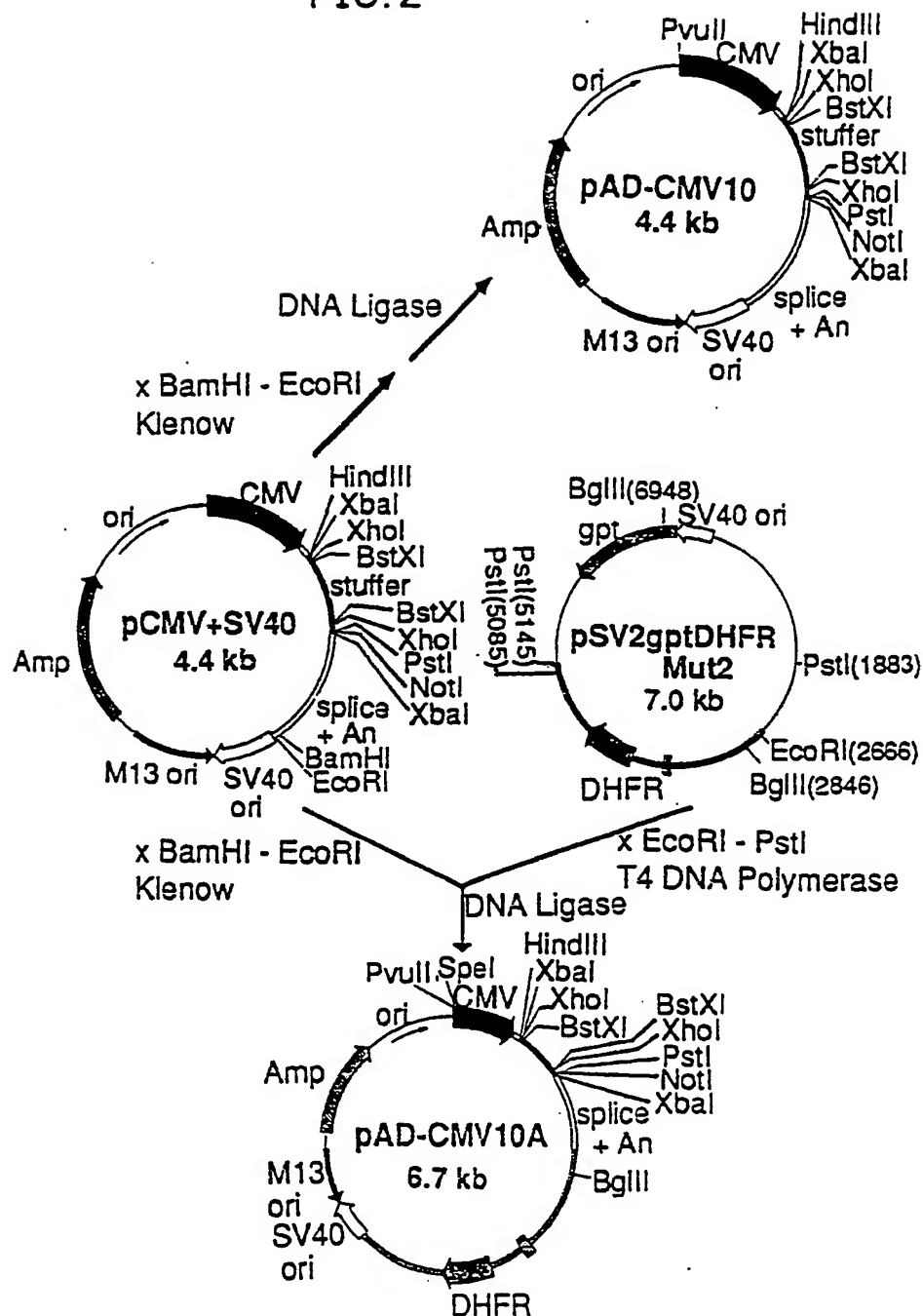
FIG.1



ERSATZBLATT

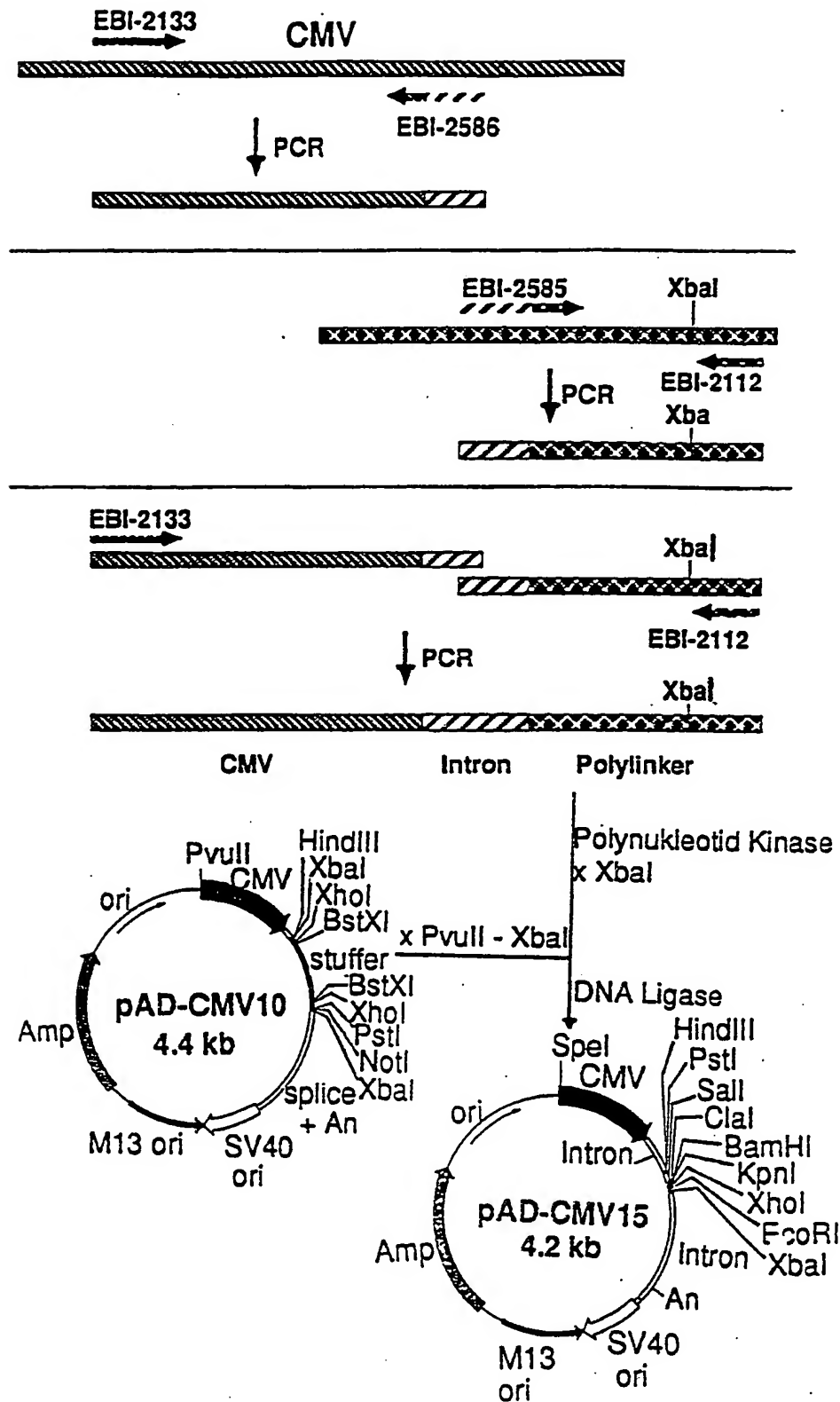
2/32

FIG. 2



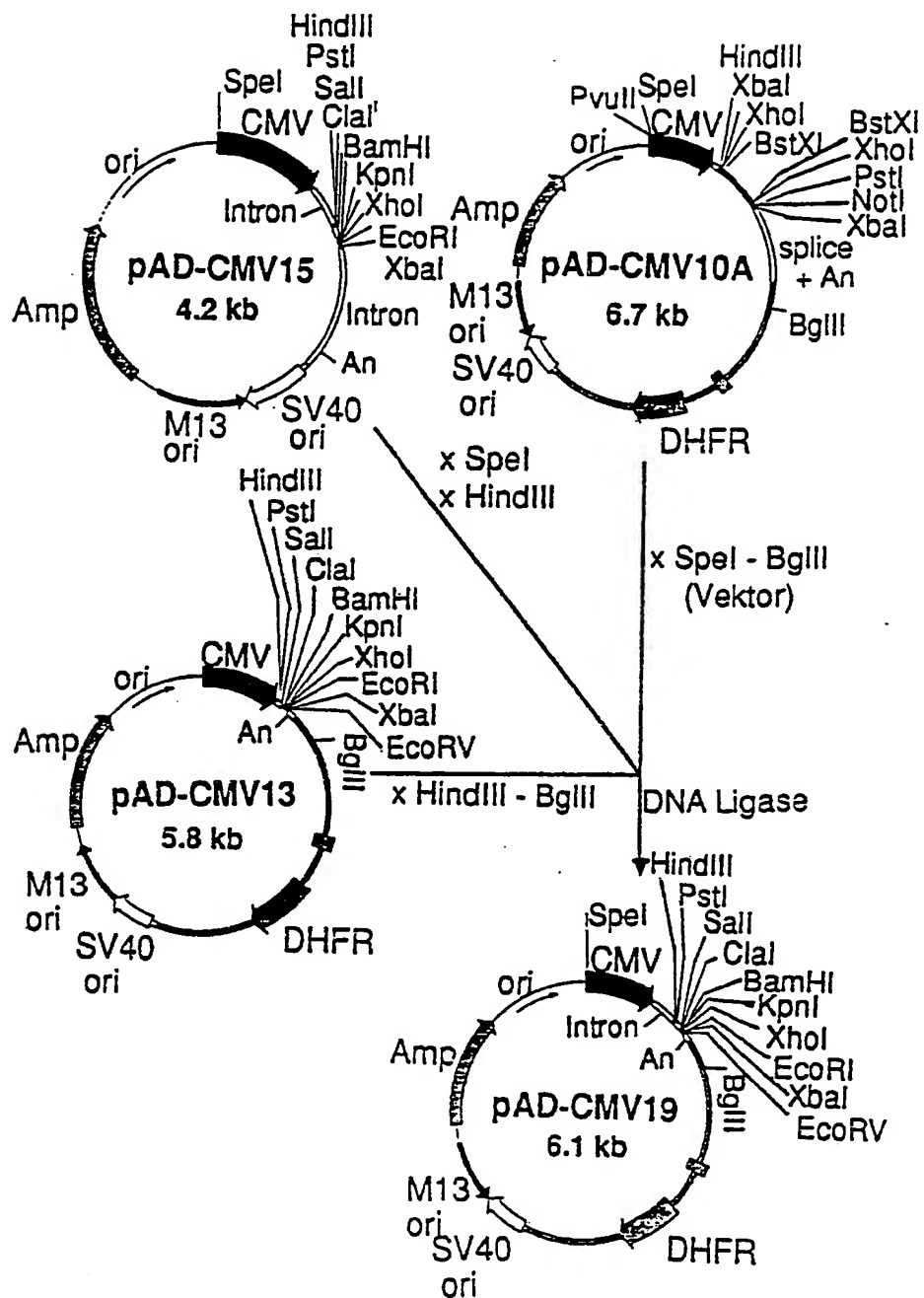
3/32

FIG. 3



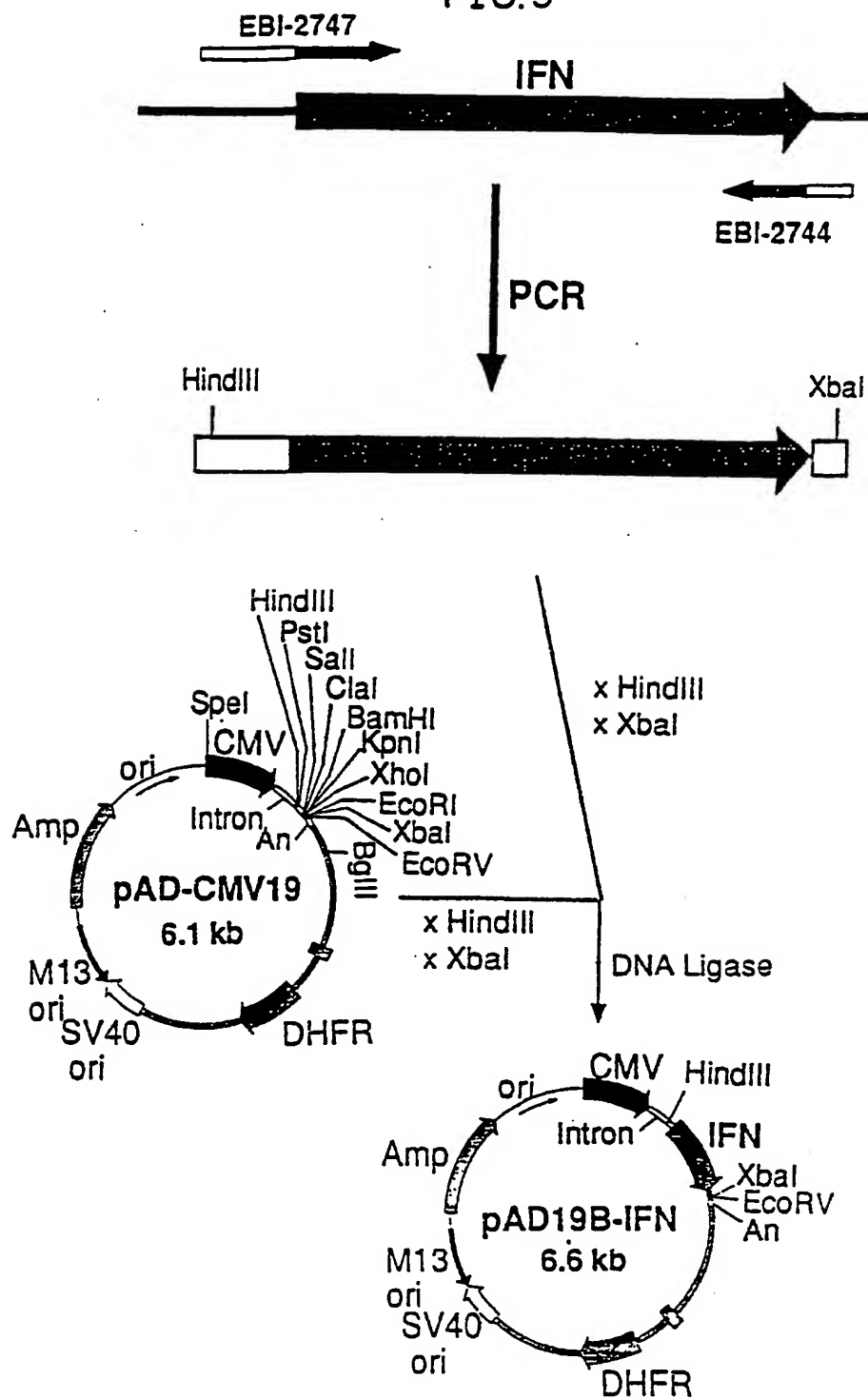
4/32

FIG. 4



5/32

FIG. 5



6/32

## FIG.6A

HindIII/XbaI - Insert von PAD19B-IFN

```

AAGCTTAC ATT TGC TTC TGA CAC AAC TGT GTT CAC TAG CAA CCT CAA ACA
 9          18          27          36          45
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
GAC ACC ATG GCC TTG ACC TTT GCT TTA TTG GTG GCC CTC CTG GTG CTC AGC TGC
54          63          72          81          90          99
-23
Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser
AAG TCA AGC TGC TCT GTG GGC TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC
108          117          126          135          144          153
Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys
AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC
162          171          180          189          198          207
Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC
216          225          234          243          252          261
Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn
CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT
270          279          288          297          306          315
Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys
CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA
324          333          342          351          360          369

```

7/32

FIG.6B

```

Phe Tyr Thr Glu Glu Leu Tyr Gln Gln Gln Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln
TTC TAC ACT GAA CTC TAC TAC CAG CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG
378 387 396 405 414 423

Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val
GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG
432 441 450 459 468 477

Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Tyr Ser Pro
AGG AAA TAC TTC CAA AGA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT
486 495 504 513 522 531

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr
TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA
540 549 558 567 576 585

Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu TER
AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGA AAACGTCTCTCTAGA
594 603 612 621 630 639

```

ERSATZBLATT



8/32  
FIG. 7A

pAD-CMV19

TCGACATTGA	TTATTGACTA	GTTATTAAATA	GTAATCAATT	ACGGGGTCAT	TAGTTCATAG	60
CCCATATATG	GAGTTCGCG	TTACATAACT	TACGGTAAAT	GGCCCCCCTG	GCTGACCGCC	120
CAACGACCCC	CGCCCCATTGA	CGTCAATAAT	GACGTATGTT	CCCATAGTAA	CGCCAATAGG	180
GACTTTCCAT	TGACGTCAAT	GGGTGGAGTA	TTTACGGTAA	ACTGCCCCACT	TGGCAGTACA	240
TCAAGTGTAT	CATATGCCAA	GTACGCCCCC	TATTGACGTC	AATGACGGTA	AATGGCCCCG	300
CTGGCATTAT	GCCCAGTACA	TGACCTTATG	GGACTTTCCT	ACTTGGCAGT	ACATCTACGT	360
ATTAGTCATC	GCTATTACCA	TGGTGATGCG	GTTTGGCAG	TACATCAATG	GGCGTGGATA	420
GCGGTTTGAC	TCACGGGGAT	TTCCAAGTCT	CCACCCCAT	GACGTCAATG	GGAGTTTGT	480
TTGGCACCAA	AATCAACGGG	ACTTTCCTAA	ATGTCGTAAC	AACTCCGCC	CATTGACGCA	540
AATGGGCGGT	AGCGGTGTAC	GGTGGGAGGT	CTATATAAGC	AGAGCTCGTT	TAGTGAACCG	600
TCAGATCGCC	TGGAGACGCC	ATCCACGCTG	TTTGGACCTC	CATAGAAGAC	ACCGGGACCG	660
ATCCAGCCTC	CGCGGCCGGG	AACGGTGCA	TGGAACGCGG	ATTCCCCGTG	CCAAGAGTCA	720
GGTAAGTACC	GCCTATAGAG	AAGACTCTTG	GGTTTCTGAT	AGGCACTGAC	TCTCTCTGCC	780
TATTGGTCTA	TTTTCCTACC	CTTAGGCTGC	TGGTGCTTAA	CTGGCTTATC	GAAATTAATA	840
CGACTCACTA	TAGGAGAGAC	CAAGCTTCTG	CAGGTCGACA	TCGATGGATC	CGGTACCTCG	900
AGCGCGAATT	CTCTAGAGAT	ATCTTGTTTA	TTGCAGCTTA	TAATGGTTAC	AAATAAAGCA	960
ATAGCATCAC	AAATTTCACA	AATAAAGCAT	TTTTTTTCACT	GCATTCTAGT	TGTGGTTTGT	1020
CCAAACTCAT	CAATGTATCT	TATCATGTCT	GGATCAATTC	TGAAAAACTA	GCCTTAAAGA	1080
CAGACAGCTT	TGTTCTAGTC	AGCCAGGCAA	GCATATGTAA	ATAAAGTTCC	TCAGGGAAC	1140
GAGGTAAAAA	GATGTATCCT	GGACCTGCCA	GACCTGGCCA	TTACAGTAAA	CAGAAGATTC	1200
CGCCTCAAGT	TCCGGTTAAC	AACAGGAGGC	AACGAGATCT	CAAATCTATT	ACTTCTAATC	1260
GGGTAAATTAA	AACCTTTCAA	CTAAAACACG	GACCCACGGA	TGTCACCCAC	TTTTCCCTCC	1320
CCGGCTCCGC	CCTTCTCAGT	ACTCCCCACC	ATTAGGCTCG	CTACTCCACC	TCCACTTCCG	1380
GGCGCGACAC	CCACGTGCCC	TCTCCCCACC	GACGCTAACC	CCGCCCTTGC	CCGTCTGACC	1440

ERSATZBLATT

9/32  
FIG.7B

CCGCCACCA CCTGGCCCCG CCCCCTTGAG GACAGAAAGAA ACCCCGGGCA GCCGCAGCCA 1500  
 AGCGGACGG GTAGACGCTG GGGCGCTGA GGAGTCGTCC TCTACCTTCT CTGCTGGCTC 1560  
 GGTGGGGAC GCGGTGGATC TCAGGCTTCC GGAAGACTGG AAGAACCAGC TCAGAACCCG 1620  
 TTGTCTCCG GGGCTTGGG CGCGGGAAGA ATGGCCGCTA GACGCGGACT TGGTGCGAGG 1680  
 CATCGCAGGA TGCAGAAAG CAAGCCCCG GGGAGCCGCG GGTGTACTA CCCCAGCCCT 1740  
 GGAGCGGCCA CGCCGACTG GCGGGGCGG GCCTGGTGGA GCGGAGTCT GACCTCGTGG 1800  
 AGCGGGGCC TCTGATGTTT AAATAGGATG CTAGGCTTGT TGAGGCGTGG CCTCCGATTC 1860  
 ACAAGTGGGA AGCAGCGCCG GCGGACTGCA ATTTCCGCGC AAACCTGGGG GAAGCACAGC 1920  
 GTACAGGCTG CCTAGGTGAT CGCTGCTGCT GTCATGGTTC GACCGCTGAA CTGCATCGTC 1980  
 GCCGTGTCC AGAATATGGG CATCGGCAAG AACGGAGACC TTCCCTGGCC AATGCTCAGG 2040  
 TACTGGCTGG ATTGGGTTAG GGAACCCGAG GCGGTTCCGT GAATCGGGTC GAGCACTGG 2100  
 CGGAGACGG CGGGCCAACT ACTTAGGGAC AGTCATGAGG GGTAGGCCCG CCGGCTGCTG 2160  
 CCTTGCCCA TGCCCGCGGT GATCCCATG CTGTGCCAGC CTTTGCCAG AGCGCTCTA 2220  
 GCTGGGAGCA AAGTCCGGTC ACTGGGCAGC ACCACCCCC GGAATTGCAT GGGTAGCCGC 2280  
 TGAGATGGAG CCTGAGCACA CGTGACAGGG TCCCTGTAA CGCAGTGTTT CTCTAACTTT 2340  
 CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACCACC TCCTCAGTGG AAGGTAAACA 2400  
 GAACCTGGTG ATTATGGGCC GGAACACCTG GTTCTCCATT CCTGAGAAGA ATCGACCTTT 2460  
 AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAGCTCAAG GAACCAACCAC AAGGAGCTCA 2520  
 TTTTCTTGC AAAAGTCTGG ACCATGCCTT AAAACTTATT GAACAACCAG AGTTAGCAGA 2580  
 TAAAGTGGAC ATGGTTTGG TAGTTGGAGG CAGTTCCGTT TACAAGGAAG CCATGAATCA 2640  
 GCCAGGCCAT CTCAGACTCT TTGTGACAA GATCATGCAG GAATTTGAAA GTGACACGTT 2700  
 CTTCCCAGAA ATTGATTGG AGAATATAA ACTTCTCCA GAGTACCCAG GGTCCCTTC 2760  
 TGAAGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAATTTGAA GTCTATGAGA AGAAAGGCTA 2820  
 ACAGAAAGAT ACTTGCTGAT TGACTTCAAG TTCTACTGCT TTCCTCCTAA AATATGCAT 2880  
 TTTTACAAGA CCAATGGGACT TGTGTTGGCT TTAGATCCCTG TGCATCCCTGG GCAACTGTTG 2940  
 TACTCTAAG CACTCCCCAA AGTCATGCCC CAGCCCCCTGT ATAATTCTAA ACAATTAGAA 3000

10/32

FIG. 7C

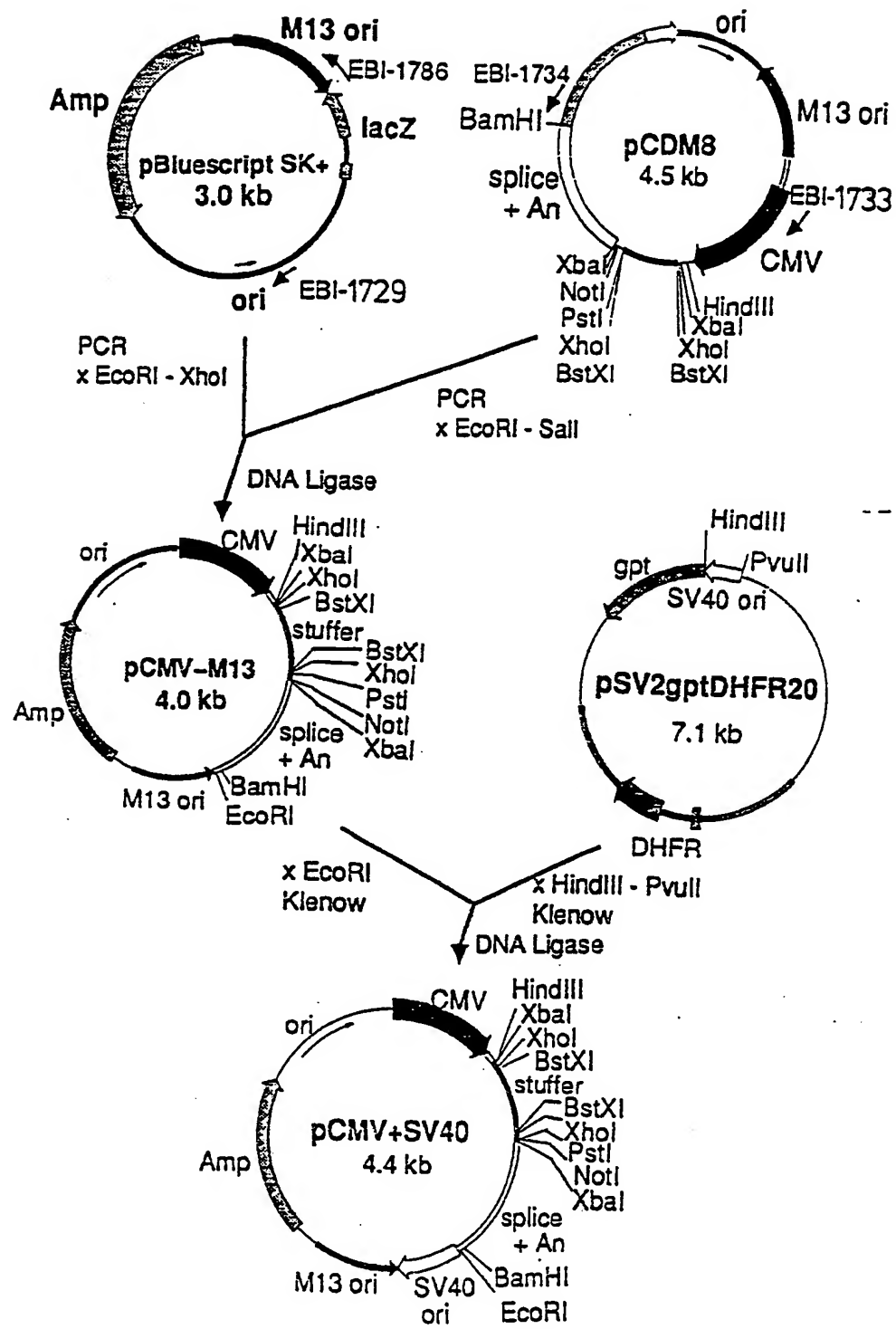
TTTATTTTCAT TTTTCATTAGT CTAACCAGGT TATATTAAAT ATACTTTAAG AACACCATTT 3060  
 TGCCATAAAG TTCTCAATGC CCTTCCCATG CAGCCTCAAG TGGCTCCCCA GCAGATGCAT 3120  
 AGGGTAGTGT GTGTACAAGA GACCCCAAAG ACATAGAGCC CCTGAGAGCA TGAGCTGATA 3180  
 TGGGGGCTCA TAGAGATAGG AGCTAGATGA ATAAGTACAA AGGGCAGAAA TGGGTTTAA 3240  
 CCAGCAGAGC TAGAACTCAG ACTTTAAAGA AAATTAGATC AAAGTAGAGA CTGAATTATT 3300  
 CTGCACATCA GACTCTGAGC AGAGTTCTGT TCACTCAGAC AGAAAATGGG TAAATTGAGA 3360  
 GCTGGCTCCA TTGTGCTCCT TAGAGATGGG AGCAGGTGGA GGATTATATA AGGTCTGGAA 3420  
 CATTTAACTT CTCCGTTTCT CATCTTCAGT GAGATTCCAA GGGATACTAC AATTCTGTGG 3480  
 AATGTGTGC AGTTAGGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA 3540  
 AGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCAGG TGTGGAAAGT CCCAGGGCTC CCCAGCAGGC 3600  
 AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA TAGTCCCGCC CCTAACTCCG 3660  
 CCCATCCCGC CCCTAACTCC GCCCAGTTCC GCCCATCTTC CGCCCCATGG CTGACTAATT 3720  
 TTTTATTATT ATGCAGAGGC CGAGGCGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT 3780  
 TTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCAAAAAG CTAATTCAGC CTGAATGGCG AATGGGAAAT 3840  
 TGTAAACGTT AATATTTTGT TAAAATTGCG GTTAAATTTT TGTTAAATCA GCTCATTTTT 3900  
 TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG 3960  
 GTTGAGTGT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT 4020  
 CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC 4080  
 AAGTTTGTGG GGTCGAGGTG CCGTAAAGCA CTAATTCGGA ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA 4140  
 TTTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGAAGGAA GAAAGCGAAA 4200  
 GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGA GCGGTCACGC TGCGCGTAAC CACCACACCC 4260  
 GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT ACAGGGCGCG TCAGGTGGCA CTTTTCGGGG AAATGTGCGC 4320  
 GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA 4380  
 TAACCCCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTATGAGTAT TCAACATTTC 4440  
 CGTGTGCGCC TTATTCCTTT TTTTGCAGCA TTTTGCCTTC CTGTTTTTGC TCACCCAGAA 4500  
 ACCGTGGTGA AAGTAAAGA TGCTGAAGAT CAGTTGGGTG CACGAGTGGG TTACATCGAA 4560

11/32

FIG.7D

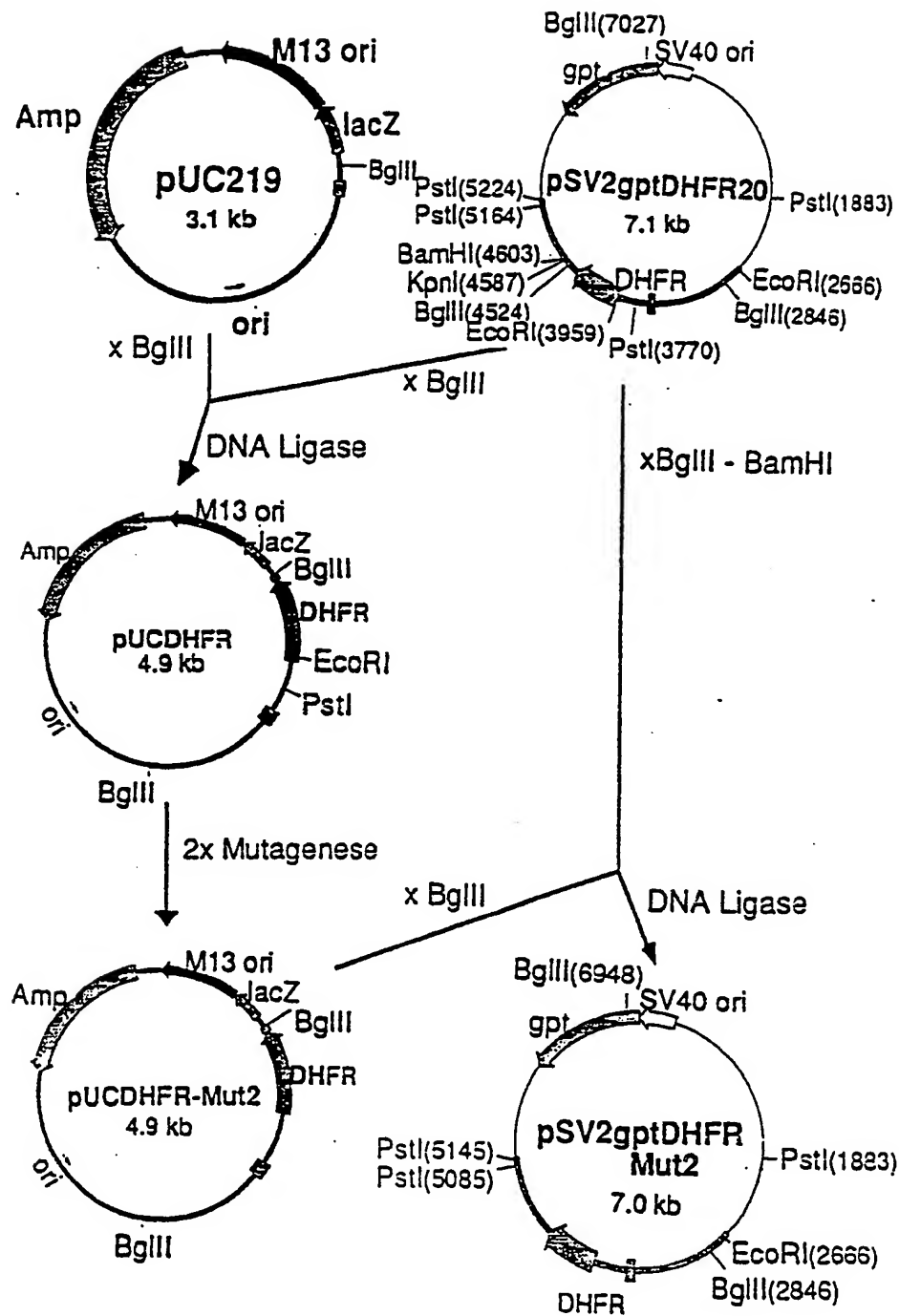
CTGGATCTCA ACAGCGGTAA GATCCTTGAG AGTTTTCGCC CCGAAGAACG TTTTCCAATG 4620  
ATGAGCACTT TTAAAGTTCT GCTATGTGGC GCGGTATTAT CCCGTATTGA CGCCGGGCAA 4680  
GAGCAACTCG GTCGCCCGCAT ACACTATTCT CAGAATGACT TGGTTGAGTA CTCACCAAGTC 4740  
ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGGCATGACA GTAAGAGAAAT TATGCAGTGC TGCCATAACC 4800  
ATGAGTGATA ACACTGCGGC CAACCTACTT CTGACAAACGA TCGGAGGACC GAAGGAGCTA 4860  
ACCGCTTTT TGCACAAACAT GGGGGATCAT GTAACTCGCC TTGATCGTTG GGAACCGGAG 4920  
CTGAATGAAG CCATACCAAA CGACGAGCGT GACACCACGA TGCCTGTAGC AATGGCAACA 4980  
ACGTTGCGCA AACTATTAAAC TGGCGAACTA CTTACTCTAG CTTCCCCGGA ACAATTAAATA 5040  
GACTGGATGG AGCGGGATAA AGTTGCAGGA CCACCTCTGC GCTCGGCCCT TCCGGCTGGC 5100  
TGGTTTATTG CTGATAAATC TGGAGCCGGT GAGCGTGGT CTGCGGGTAT CATTGCAGCA 5160  
CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC CTCCCCTATC GTAGTTATCT ACACGACGGG GAGTCAGGCA 5220  
ACTATGGATG AACGAAATAG ACAGATCGCT GAGATAGGTG CCTCACTGAT TAAGCATTTG 5280  
TAACTGTCAG ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAACT TCATTTTAA 5340  
TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT CCCTTAACGT 5400  
GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC TTCCTTGAGAT 5460  
CCTTTTTC TCGCGGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCAACCGT ACCAGCGGTG 5520  
GTTTGTTCG CCGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAACTGG CTTCAAGCAGA 5580  
GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA CTTCAAGAAC 5640  
TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC TGCTGCCAGT 5700  
GGCGATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA TAAGGCGCAG 5760  
CGGTCGGGCT GAACGGGGG TTCGTGCACA CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC GACCTACACC 5820  
GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA AGGGAGAAAG 5880  
GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG GGAGCTTCCA 5940  
GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC GCCACCTCTG ACTTGAGCGT 6000  
CGATTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG CAACGCAGCT 6060  
GC

ERSATZBLATT

12/32  
FIG. 8

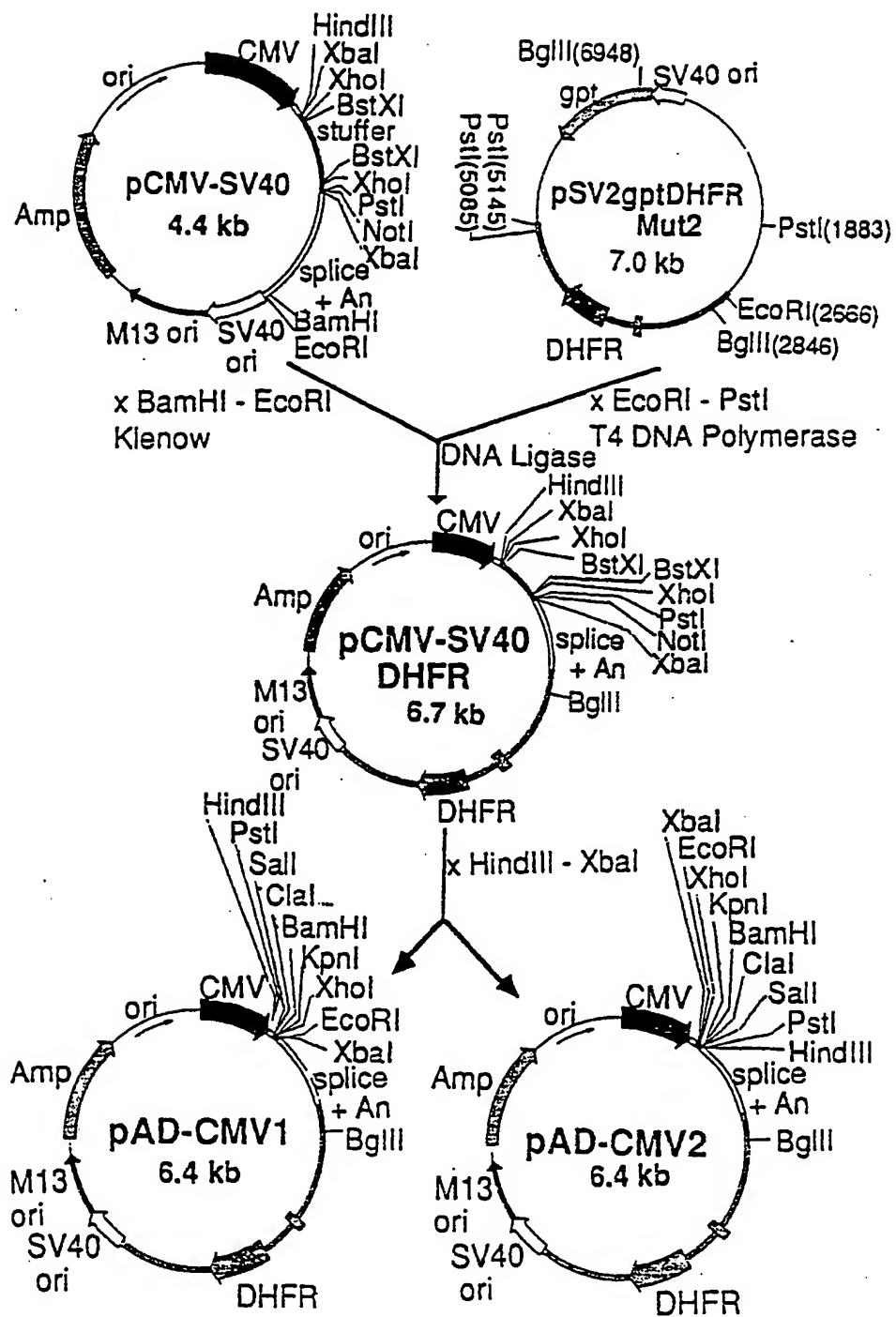
13/32

FIG. 9



14/32

FIG.10



15/32

FIG.11A

pAD-CMV1 : 6414 bp

```

TCGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGTGCAT TAGTTCATAG      60
CCCATATATG GAGTTCGCGG TTACATAAAT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC      120
CAACGACCCC CGCCCATTTGA CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG      180
GACTTTCCAT TGACGTCAAT GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA      240
TCAAGTGTAT CATATGCCAA GTACGCCCCC TATTGACGTC AATGACGTA AATGGCCCCG      300
CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG GGACTTTCCCT ACTTGGCAGT ACATCTACGT      360
ATTAGTCATC GCTATTACCA TGGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GGCGTGGATA      420
GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT CCACCCCATT GACGTCAATG GGAGTTTGTT      480
TTGGCACCAA AATCAACGGG ACTTTCCAAA ATGTCGTAAC AACTCCGCC CATTGACGCA      540
AATGGGCGGT AGGCGTGTAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCTCT GGCTAACTAG      600
AGAACCCACT GCTTAACCTG CTTATCGAAA TTAATACGAC TCACATATAGG GAGACCCCAAG      660
CTTCTGCAGG TCGACATCGA TGGATCCGGT ACCTCGAGCG CGAATTCTCT AGAGGATCTT      720
TGGAAGGAA CCTTACTTCT GTGGTGTGAC ATAATTGGAC AAACCTACCTA CAGAGATTTA      780
AAGCTCTAAG GTAAATATAA AATTTTAAAG TGTATAATGT GTTAAACTAC TGATTCTAAT      840
TGTTTGTGTA TTTTAGATTG CAACCTATGG AACTGATGAA TGGGAGCAGT GGTGGAATGC      900
CTTTAATGAG GAAAACCTGT TTTGCTCAGA AGAAATGCCA TCTAGTGATG ATGAGGCTAC      960
TGCTGACTCT CAACATTCTA CTCCTCCCAA AAAGAAGAGA AAGGTAGAAG ACCCCAAGGA      1020
CTTTCCTTCA GAATTGCTAA GTTTTGTGAG TCATGCTGTG TTTAGTAATA GAACTCTTGC      1080
TTGCTTTGCT ATTTACACCA CAAAGGAAAA AGCTGCACCTG CTATACAAGA AAATTATGGA      1140
AAAATATTG ATGTATAGTG CCTTGACTAG AGATCATAAT CAGCCATACC ACATTGTAG      1200
AGGTTTACT TGCTTTAAA AACCTCCAC AACCTCCCTT GAACCTGAAA CATAAAATGA      1260
ATGCAATTGT TGTGTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA      1320
GCATCACAAA TTTCACAAAAT AAAGCATTTT TTTCACCTGCA TTCTAGTTGT GGTGTGTCCA      1380
AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCAATTCTGA GAAACTAGCC TTAAGACACAG      1440
ACAGCTTTGT TCTAGTCAGC CAGGCAAGCA TATGTAATAA AAGTTCCTCA GGGAACTGAG      1500

```

ERSATZBLATT



16/32

FIG.11B

GTTAAAGAT GTATCCTGGA CCTGCCAGAC CTGGCCATTG ACGTAAACAG AAGATCCCGC 1560  
 CTCAAGTTCC GGTAAACAAC AGGAGGCAAC GAGATCTCAA ATCTATTACT TCTAATCGGG 1620  
 TAATTAAAC CTTTCAACTA AAACACGGAC CCACGGATGT CACCCACTTT TCCCTCCCGC 1680  
 GCTCCGCCCT TCTCAGTACT CCCACCATTT AGGCTCGCTA CTCACCTCC ACTTCCGGGC 1740  
 GCGACACCCA CGTGCCCTCT CCCACCCGAC GCTAACCCCG CCCCTGCCCG TCTGACCCCG 1800  
 CCCACCACT GGCCTCCGCC CGTTGAGGAC AGAAGAAACC CCGGCAGCC GCAGCCAAGG 1860  
 CGGACGGGTA GACGCTGGGG GCGCTGAGGA GTCGTCTCTT ACCTTCTCTG CTGGCTCGGT 1920  
 GGGGACGCG GTGGATCTCA GGCTTCCGGA AGACTGGAAG AACCGCTCA GAACCGCTTG 1980  
 TCTCCGCGGG GCTTGGCGGG CGGAAGAATG GCCGCTAGAC GCGACTTGG TCGGAGGCAT 2040  
 CGCAGGATGC AGAAGAGCAA GCCGCCGGG AGCGCGCGG TGTACTACCC CGCGCCTGGA 2100  
 GCGGCCACGC CGGACTGGGC GGGGCCGGCC TGGTGGAGGC GGAGTCTGAC CTCGTGGAGG 2160  
 CGGGCCCTCT GATGTTCAAA TAGGATGCTA GGCTTGTGA GCGTGGCCT CCGATTACACA 2220  
 AGTGGGAAGC AGCGCCGGGC GACTGCAATT TCGCGCCAAA CTTGGGGAA GCACAGCGTA 2280  
 CAGGCTGCCT AGGTGATCGC TGCTGCTGTC ATGGTTCGAC CGCTGAACTG CATCGTCGCC 2340  
 GTGTCCAGA ATATGGGCAT CGGCAAGAAC GGAGACCTTC CCTGGCCAAT GCTCAGGTAC 2400  
 TGGCTGGATT GGGTTAGGGA AACCGAGCG GTTCGCTGAA TCGGGTCGAG CACTTGGCGG 2460  
 AGACGCGCGG GCCAACTACT TAGGGACAGT CATGAGGGGT AGGCCCGCCG GCTGCTGCCC 2520  
 TTGCCCATGC CCGCGGTGAT CCCCATGCTG TGCCAGCCTT TGCCAGAGG CGCTCTAGCT 2580  
 GGGAGCAAAG TCCGGTCACT GGGCAGCACC ACCCCCGGA CTGTCATGG TAGCCGCTGA 2640  
 GATGGAGCCT GAGCACACGT GACAGGGTCC CTGTTAACGC AGTGTCTTC TAACTTTCAG 2700  
 GAACGAGTTC AGTACTTCC AAAGAATGAC CACCACCTCC TCAGTGGAA GTAAACAGAA 2760  
 CCTGGTGATT ATGGGCCGGA AAACCTGGTT CTCCATTCTT GAGAAAGATC GACCTTTAA 2820  
 GGACAGAATT AATATAGTTC TCAGTAGAGA GCTCAAGGAA CCACCACAAG GAGCTCATTT 2880  
 TCTTGCCAAA AGTCTGGACC ATGCCTTAAA ACTTATTGAA CAACCAGAGT TAGCAGATAA 2940  
 AGTGGACATG GTTTGGATAG TTGGAGGCAG TTCCGTTTAC AAGGAAGCCA TGAATCAGCC 3000  
 AGCCATCTC AGACTCTTTG TGACAAGGAT CATGCAGGAA TTTGAAAGTG ACACGTTCTT 3060

ERSATZBLATT

17/32  
FIG. 11C

CCCAGAAATT GATTGGAGA AATATAAACT TCTCCAGAG TACCAGGGG TCCTTCTGA 3120  
 AGTCCAGGAG GAAAAGGCA TCAAGTATAA ATTTGAAGTC TATGAGAAGA AAGGCTAACA 3180  
 GAAAGATACT TGCTGATTGA CTTCAAGTTC TACTGCTTTC CTCCTAAAT TATGCATTTT 3240  
 TACAAGACCA TGGGACTTGT GTTGGCTTTA GATCCTGTGC ATCCTGGGCA ACTGTTGTAC 3300  
 TCTAAGCCAC TCCCCAAAGT CATGCCCCAG CCCCTGTATA ATTCTAAACA ATTAGAATTA 3360  
 TTTTCATTTT CATTAGTCTA ACCAGGTTAT ATTAATATA CTTTAAGAAA CACCATTTCG 3420  
 CATAAAGTTC TCAATGCCCC TCCCATGCAG CCTCAAGTGG CTCCCAGCA GATGCATAGG 3480  
 GTAGTGTGTG TACAAGAGAC CCCAAAGACA TAGAGCCCC TAGAGCATGA GCTGATATGG 3540  
 GGGCTCATAG AGATAGGAGC TAGATGAATA AGTACAAAGG GCAGAAATGG GTTTTAACCA 3600  
 GCAGAGCTAG AACTCAGACT TTAAGAAAAA TTAGATCAAA GTAGAGACTG AATTATTCTG 3660  
 CACATCAGAC TCTGAGCAGA GTTCTGTTCA CTCAGACAGA AAATGGGTAA ATTGAGAGCT 3720  
 GGCTCCATTG TGCTCCCTTAG AGATGGGAGC AGGTGGAGGA TTATAAAGG TCTGGAACAT 3780  
 TTAACCTTC CGTTCCTCAT CTTCAGTGAG ATTCCAAGG ATACTACAAT TCTGTGGAAT 3840  
 GTGTGTCAGT TAGGGTGTGG AAAGTCCCCA GGCTCCCCAG CAGGCAGAAG TATGCAAAGC 3900  
 ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT GGAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA 3960  
 AGTATGCAAA GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC 4020  
 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTT 4080  
 TTTATTATG CAGAGGCCGA GCGCCCTCTG AGCTATTCCA GAAGTAGTGA GGAGGCTTTT 4140  
 TTGGAGGCCT AGGCTTTTCG AAAAAAGCTA ATTCAGCCTG AATGGCGAAT GGGACGCGCC 4200  
 CTGTAGCGGC GCATTAAAGC CGGCGGGTGT GGTGGTTACG CGCAGCGTGA CCGCTACACT 4260  
 TGCCAGCGCC CTAGCGCCCG CTCCTTTTCGC TTTCTTCCCT TCCTTCTCG CCACGTTCCG 4320  
 CGGCTTTCCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTTCCGAT TTAGTGCTTT 4380  
 ACGGCACCTC GACCCCAAAA ACTTGATTAG GGTGATGTT CACGTAGTGG GCCATCGCCC 4440  
 TGATAGACGG TTTTTCGCCC TTGACGTTG GAGTCCACGT TCTTTAATAG TGGACTCTTG 4500  
 TTCCAAACTG GAACAACACT CAACCTATC TCGGTCTATT CTTTGTATT ATAAGGATT 4560  
 TTGCCGATT CGGCCTATT GTTAAAAAAT GAGCTGATT AACAAAAAT TAACGCGAAT 4620

18/32  
FIG.11D

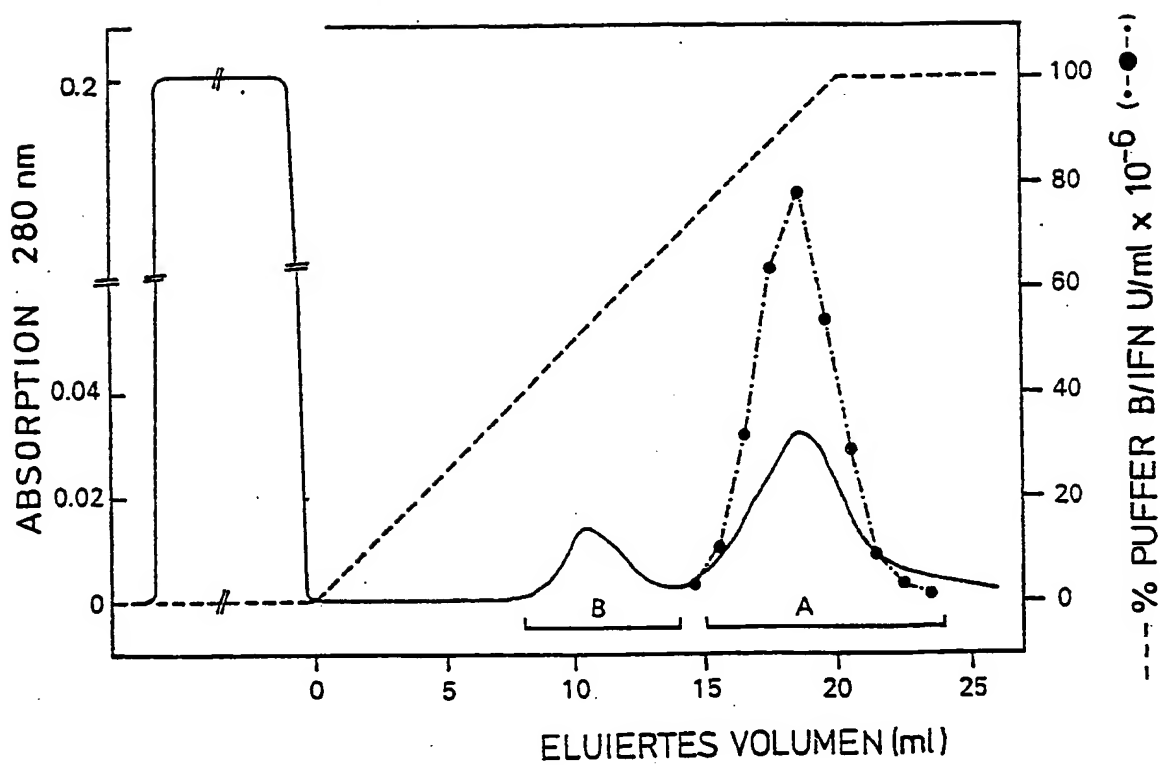
TTTAACAAA TATTAACGTT TACAATTTC GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA 4680  
ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAATAACAT TCAAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA 4740  
CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCTG 4800  
GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TCGGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG 4860  
CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG 4920  
GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG 4980  
AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG 5040  
CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA 5100  
GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG 5160  
AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC 5220  
GCTTTTTCG ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG 5280  
AATGAAGCCA TACCAAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG 5340  
TTGCGCAAAC TATTAACCTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC 5400  
TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG 5460  
TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG 5520  
GCCCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT 5580  
ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA 5640  
CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACCTCA TTTTAAATTT 5700  
AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG 5760  
TTTTTCGTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT 5820  
TTTTTCTGCG GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT 5880  
TGTTTGCCCG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCGGAAGG TAACCTGGCTT CAGCAGAGCG 5940  
CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACCTT CAAGAACTCT 6000  
GTAGCACCGC CTACATAACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC 6060  
GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG 6120  
TCGGGCTGAA CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA 6180

19/32  
FIG. 11E

CTGAGATACC	TACAGCGTGA	GCATTGAGAA	AGCGCCACGC	TTCCCCGAAGG	GAGAAAGGCG	6240
GACAGGTATC	CGGTAAGCGG	CAGGGTCGGA	ACAGGAGAGC	GCACGAGGGA	GCTTCCAGGG	6300
GGAAACGCCCT	GGTATCTTTA	TAGTCCTGTC	GGGTTTCGCC	ACCTCTGACT	TGAGCCGTCGA	6360
TTTTTGTGAT	GCTCGTCAGG	GGGGCGGAGC	CTATGGAAAA	ACGCCAGCAA	CGCC	

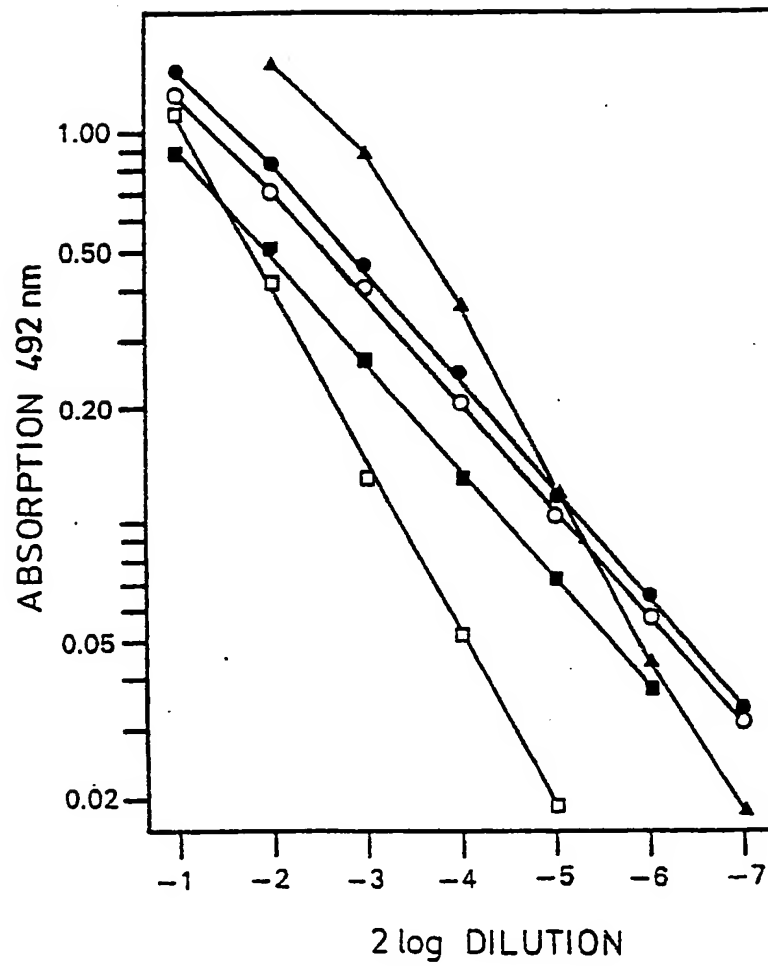
20/32

FIG.12



21/32

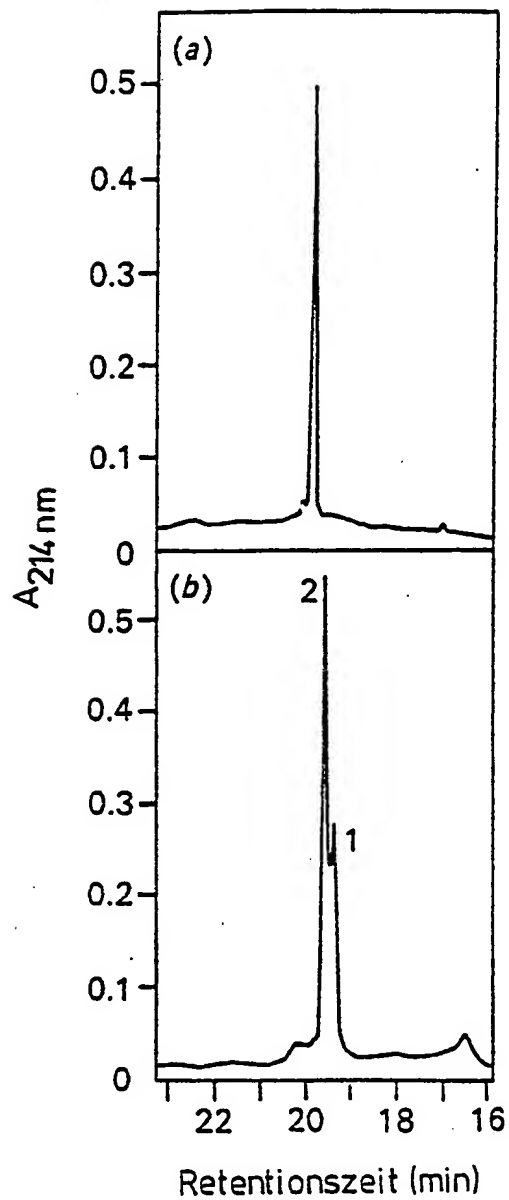
FIG.13



ERSATZBLATT

22/32

FIG. 14



23/32  
FIG.15

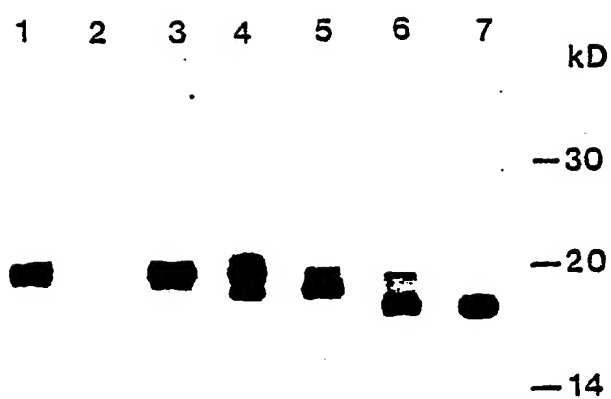
1 5 10 15  
CYS-ASP-LEU-PRO-GLN-THR-HIS-SER-LEU-GLY-SER-ARG-ARG-THR-LEU-  
20 25 30  
MET-LEU-LEU-ALA-GLN-MET-ARG-ARG-ILE-SER-LEU-PHE-SER-CYS-LEU-  
35 40 45  
LYS-ASP-ARG-ARG-ASP-PHE-GLY-PHE-PRO-GLN-GLU-GLU-PHE-GLY-ASN-  
50 55 60  
GLN-PHE-GLN-LYS-ALA-GLU-THR-ILE-PRO-VAL-LEU-HIS-GLU-MET-ILE-  
65 70 75  
GLN-GLN-ILE-PHE-ASN-LEU-PHE-SER-THR-LYS-ASP-SER-SER-ALA-ALA-  
80 85 90  
TRP-ASP-GLU-THR-LEU-LEU-ASP-LYS-PHE-TYR-THR-GLU-LEU-TYR-GLN-  
95 100 105  
GLN-LEU-ASN-ASP-LEU-GLU-ALA-CYS-VAL-ILE-GLN-GLY-VAL-GLY-VAL-  
110 115 120  
THR-GLU-THR-PRO-LEU-MET-LYS-GLU-ASP-SER-ILE-LEU-ALA-VAL-ARG  
125 130 135  
LYS-TYR-PHE-GLN-ARG-ILE-THR-LEU-TYR-LEU-LYS-GLU-LYS-LYS-TYR-  
140 145 150  
SER-PRO-CYS-ALA-TRP-GLU-VAL-VAL-ARG-ALA-GLU-ILE-MET-ARG-SER-  
155 160 165  
PHE-SER-LEU-SER-THR-ASN-LEU-GLN-GLU-SER-LEU-ARG-SER-LYS-GLU

 $\alpha 2c$ 

ERSATZBLATT

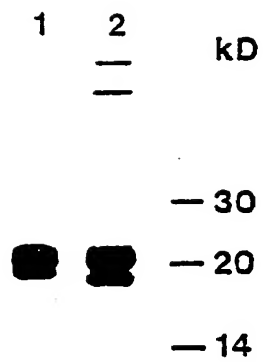


24/32  
FIG. 16



25/32

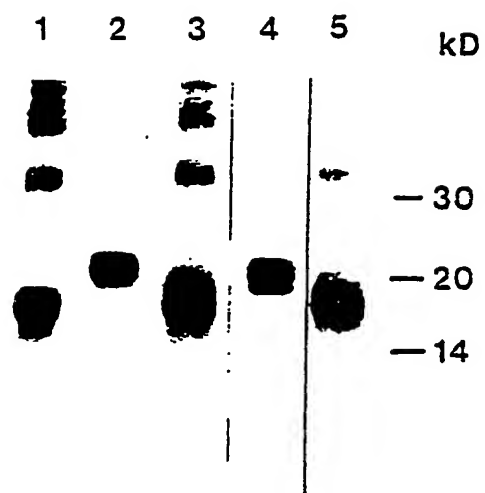
FIG. 17



ERSATZBLATT

26/32

FIG.18



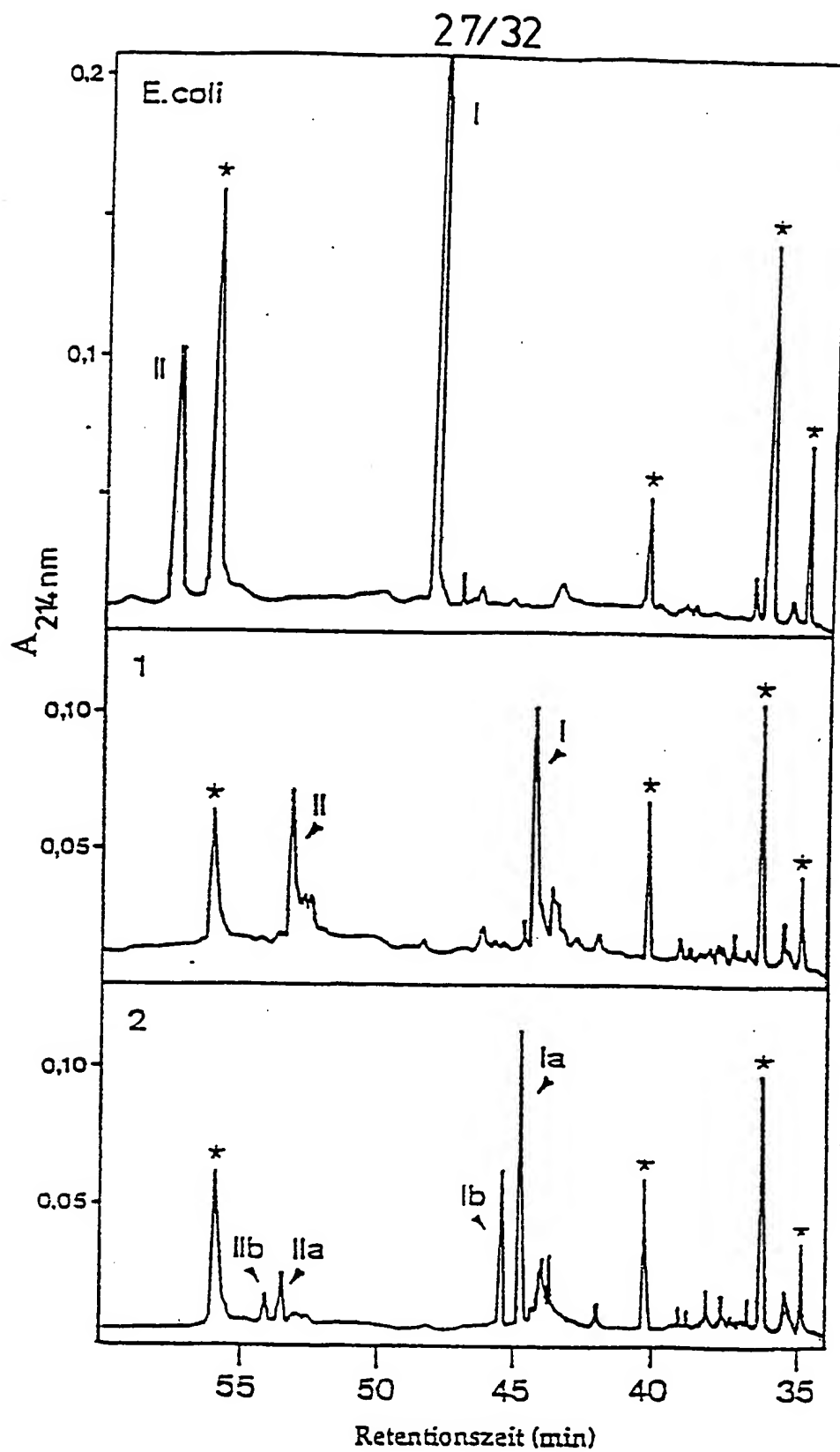
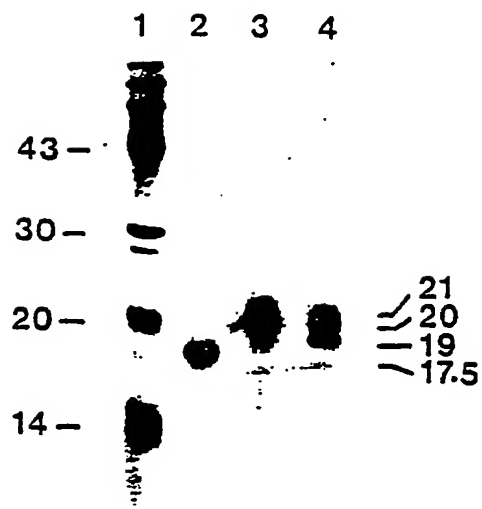


FIG. 19

ERSATZBLATT

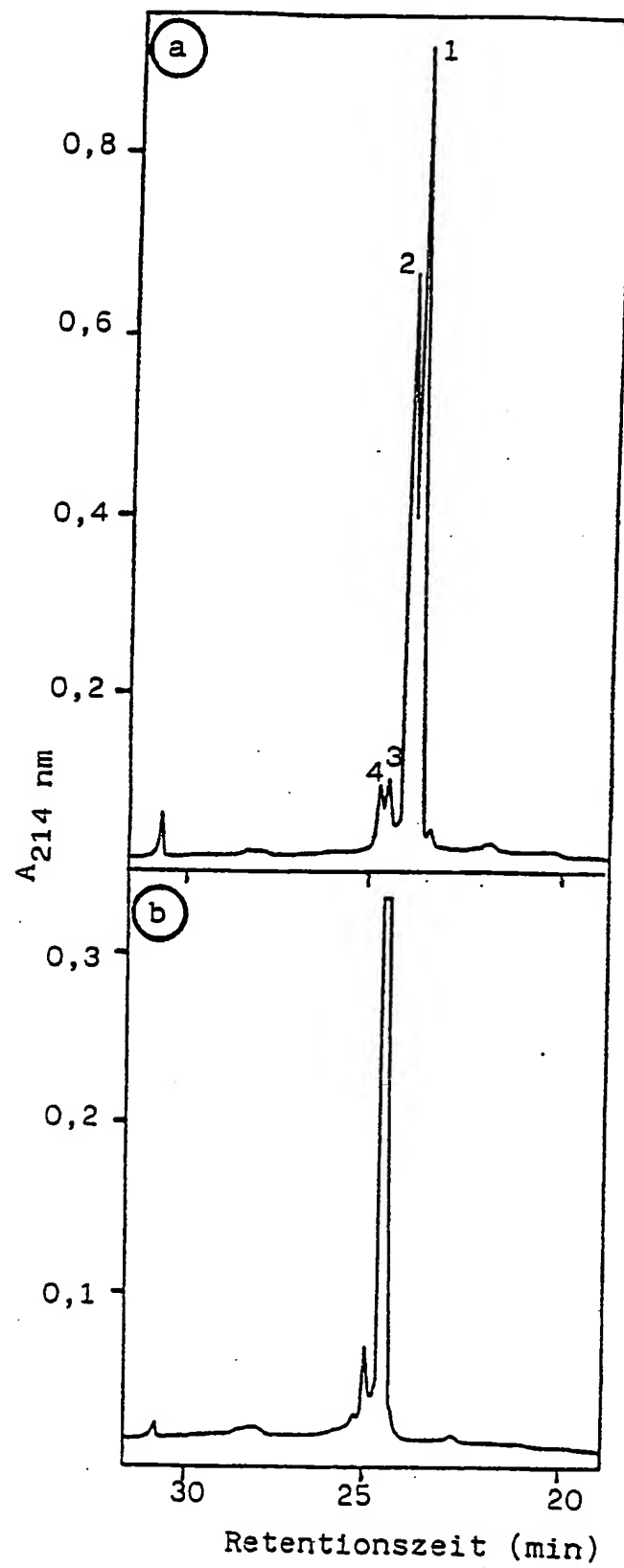
28/32

FIG. 20



29/32

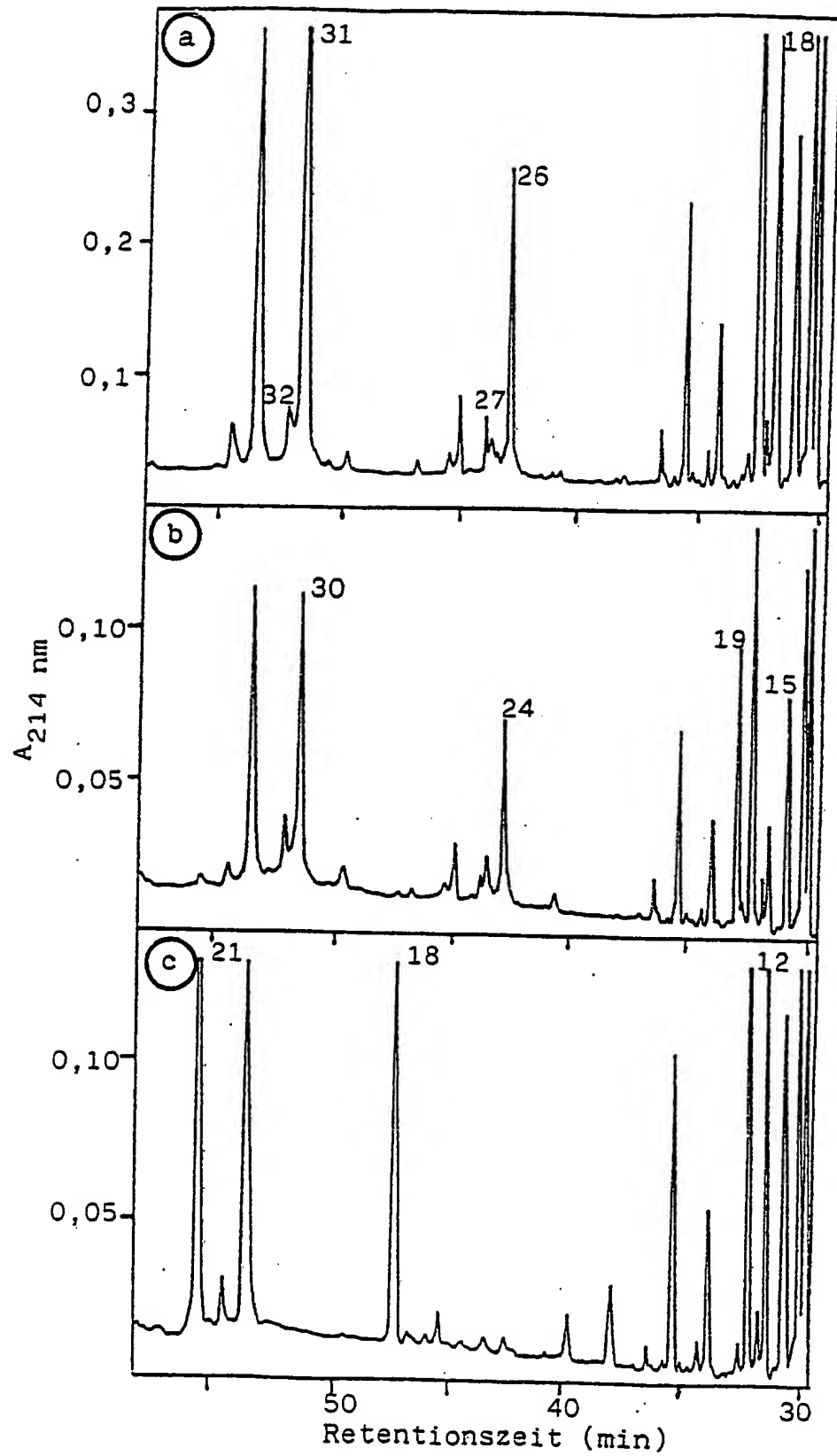
FIG. 21



ERSATZBLATT

30/32

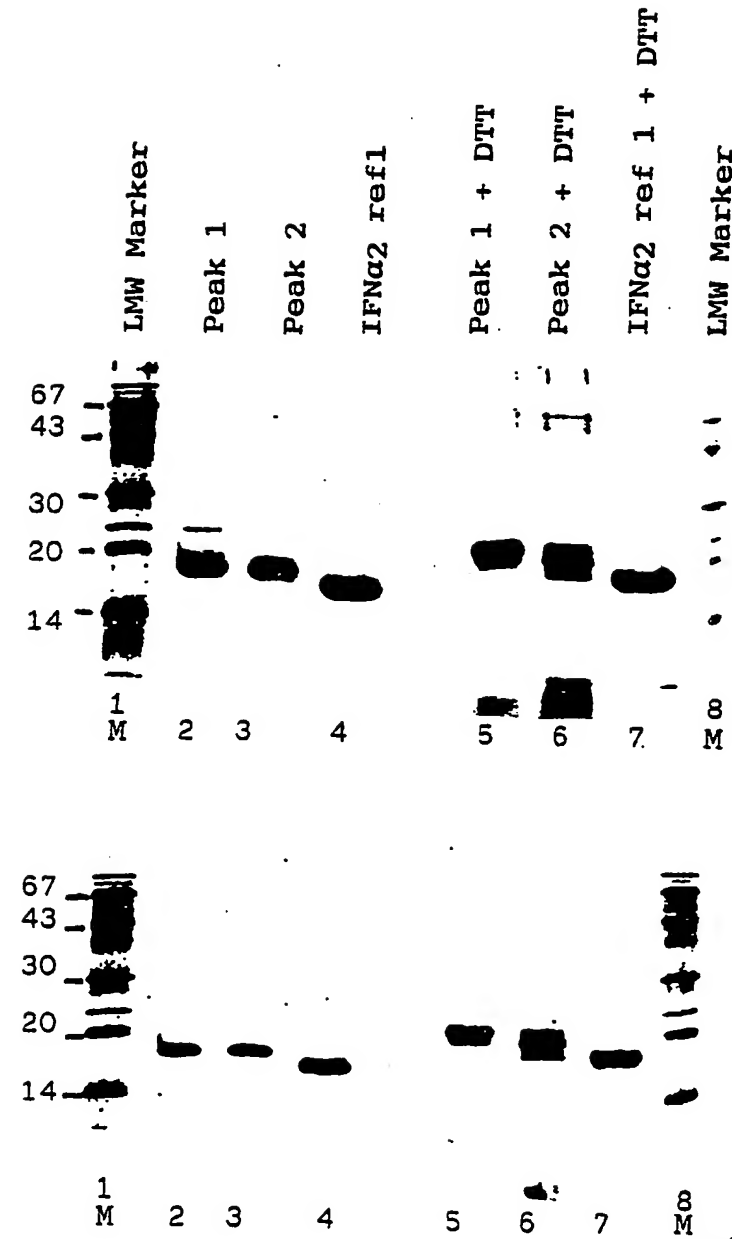
FIG. 22



ERSATZBLATT

31/32

FIG. 23

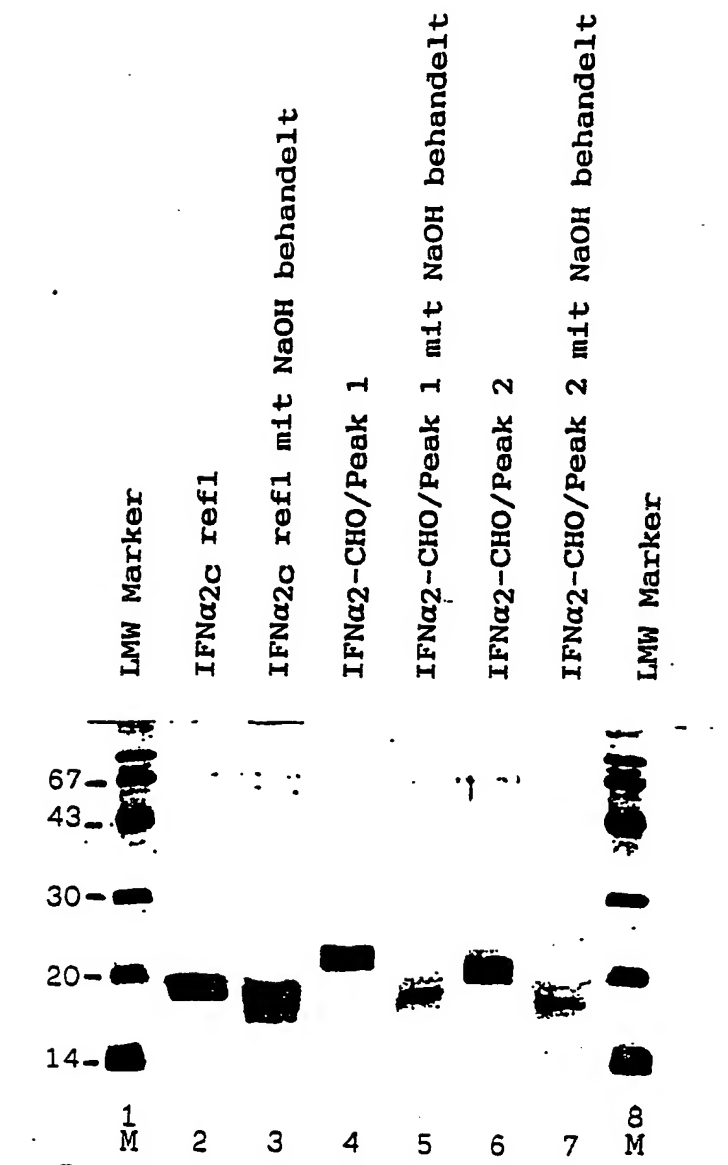


ERSATZBLATT



32/32

FIG. 24



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01266

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <b>Int. Cl.<sup>5</sup> C12N15/21; C12P21/02; C12P21/08; A61K37/66</b> </div>						
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">             Minimum Documentation Searched †           </div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">Classification System  </td> <td style="width: 50%; border: none;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="height: 40px; vertical-align: top; padding-top: 10px;"> <b>Int. Cl.<sup>5</sup> C07K; C12N; C12P</b> </td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">             Documentation Searched other than Minimum Documentation              to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *           </div>			Classification System	Classification Symbols	<b>Int. Cl.<sup>5</sup> C07K; C12N; C12P</b>	
Classification System	Classification Symbols					
<b>Int. Cl.<sup>5</sup> C07K; C12N; C12P</b>						
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ‡</b>						
<b>Category *</b>	<b>Citation of Document, †† with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡‡</b>	<b>Relevant to Claim No. ‡‡</b>				
Y	US, A, 4 289 690 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.,) 15 September 1981 see column 21, line 32 - line 41; tables 3,5,7 —	1-6,12-15				
Y	JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH vol. 9 SUP, No.2, 1989, page 184; K. ZOON ET AL: "Chemical characterization of human lymphoblastoid interferon-alpha species." see abstract —	1-6,12-15				
A	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS vol. 232, No.1, July 1984, NEW YORK pages 422 - 426; JAMES E.LAEDON ET AL: "Some species of human leukocyte interferon are glycosylated." see the whole document —	1-6,12-15				
-/-						
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * Special categories of cited documents: †‡            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.            "A" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: †‡ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
* Special categories of cited documents: †‡ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family					
<b>IV. CERTIFICATION</b>						
<b>Date of the Actual Completion of the International Search</b> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <b>23 October 1991 (23.10.91)</b> </div>		<b>Date of Mailing of this International Search Report</b> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <b>25 November 1991 (25.11.91)</b> </div>				
<b>International Searching Authority</b> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <b>European Patent Office</b> </div>		<b>Signature of Authorized Officer</b>				

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	<p>NATURE. vol. 287, 2 October 1980, LONDON GB pages 408-411; G.ALLEN ET AL: "A family of structural genes for human lymphoblastoid-leukocyte-type-inter- feron." see page 410, right-hand column; figure 2</p>	1-6, 12-15
X	<p>WO, A, 8 300 693 (BERT, KURT, FRIMANN) 3 March 1983 see claims</p>	1-6, 12-15
X	<p>DE, A, 3 306 060 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23 August 1984 cited in the application see examples 1, 4, 5</p>	1-6
X	<p>THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 68, No. 6, June 1987, COLCHESTER.GB. pages 1669-1676; G.R.ADOLF: "Antigenic structure of human interferon <math>\omega</math>-IFN <math>\alpha</math>1 I- : comparison with other human interferons." cited in the application see the whole document</p>	1-6, 12-15
A	<p>EP, A, 158 420 (SCHERING CORPORATION) 16 October 1985 see claims</p>	1-6
P, X	<p>THE BIOCHEMICAL JOURNAL vol. 276, No. 2, 29 May 1991, COLCHESTER.GB. pages 511-518; G.R.ADOLF ET AL: "Natural interferon-<math>\alpha</math>2 is O-glycosylated." see the whole document</p>	1-15

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9101266  
SA 48946

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

23/10/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
-----				
US-A-4289690	15-09-81	AU-B-	561672	14-05-87
		AU-A-	1586683	08-12-83
		AU-B-	535936	12-04-84
		AU-A-	5313679	29-05-80
		BE-A-	880201	22-05-80
		CA-A-	1129409	10-08-82
		CH-A-	654843	14-03-86
		CH-A-	653347	31-12-85
		CH-A-	658459	14-11-86
		DE-A, C	2947134	12-06-80
		FR-A, B	2442054	20-06-80
		GB-A, B	2037296	09-07-80
		LU-A-	81918	04-06-81
		NL-A-	7908516	28-05-80
		SE-B-	454276	18-04-88
		SE-A-	7909721	16-06-80
		AT-B-	367769	26-07-82
		JP-A-	58192896	10-11-83
		JP-B-	63038330	29-07-88
		JP-C-	1482912	27-02-89
		JP-A-	55094320	17-07-80
		JP-B-	62061040	18-12-87
		JP-A-	63164897	08-07-88
		US-A-	4503035	05-03-85
-----				
WO-A-8300693	03-03-83	AU-A-	8820782	08-03-83
		EP-A-	0085693	17-08-83
-----				
DE-A-3306060	23-08-84	EP-A-	0119476	26-09-84
		JP-A-	59224687	17-12-84
-----				
EP-A-158420	16-10-85	FR-A-	2560212	30-08-85
		US-A-	4973556	27-11-90
-----				

EPO FORM P0073

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

**I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS** (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)<sup>6</sup>

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N15/21 ; C12P21/02 ; C12P21/08 ; A61K37/66

**II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE**Recherchierte Mindestprüfstoff<sup>7</sup>

Klassifikationssystem

Klassifikationssymbole

Int.Kl. 5

C07K ; C12N ; C12P

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup>**III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>**

Art. <sup>9</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
Y	US,A,4 289 690 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.,) 15. September 1981. siehe Spalte 21, Zeile 32 - Zeile 41; Tabellen 3,5,7	1-6, 12-15
Y	--- JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH Bd. 9 SUP, Nr. 2, 1989, Seite 184; K.ZOON ET AL: 'Chemical characterization of human lymphoblastoid interferon-alpha species.' siehe Zusammenfassung	1-6, 12-15
A	--- ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS Bd. 232, Nr. 1, Juli 1984, NEW YORK Seiten 422 - 426; JAMES E. LABDON ET AL: 'Some species of human leukocyte interferon are glycosylated.' siehe das ganze Dokument	1-6, 12-15

<sup>9</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

-/-

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

**IV. BESCHIEINIGUNG**

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. OKTOBER 1991

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25. 11. 91

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift der bevollmächtigten Beamtinnen

LE CORNEC N.D.R.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>NATURE. Bd. 287, 2. Oktober 1980, LONDON GB Seiten 408 - 411; G.ALLEN ET AL: 'A family of structural genes for human lymphoblastoid -leukocyte-type-interferon.' siehe Seite 410, rechte Spalte; Abbildung 2</p>	1-6, 12-15
X	<p>WO,A,8 300 693 (BERG,KURT,FRIMANN) 3. März 1983  siehe Ansprüche</p>	1-6, 12-15
X	<p>DE,A,3 306 060 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23. August 1984 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiele 1,4,5</p>	1-6
X	<p>THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY Bd. 68, Nr. 6, Juni 1987, COLCHESTER.GB. Seiten 1669 - 1676; G.R.ADOLF: 'Antigenic structure of human interferon <math>\omega</math> -IFN <math>\alpha</math>11 I- : comparison with other human interferons.' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p>	1-6, 12-15
A	<p>EP,A,158 420 (SCHERING CORPORATION) 16. Oktober 1985 siehe Ansprüche</p>	1-6
P,X	<p>THE BIOCHEMICAL JOURNAL Bd. 276, Nr. 2, 29. Mai 1991, COLCHESTER.GB. Seiten 511 - 518; G.R.ADOLF ET AL: 'Natural interferon-<math>\alpha</math>2 is O-glycosylated.' siehe das ganze Dokument</p>	1-15

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9101266  
SA 48946

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

23/10/91

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
-----				
US-A-4289690	15-09-81	AU-B-	561672	14-05-87
		AU-A-	1586683	08-12-83
		AU-B-	535936	12-04-84
		AU-A-	5313679	29-05-80
		BE-A-	880201	22-05-80
		CA-A-	1129409	10-08-82
		CH-A-	654843	14-03-86
		CH-A-	653347	31-12-85
		CH-A-	658459	14-11-86
		DE-A, C	2947134	12-06-80
		FR-A, B	2442054	20-06-80
		GB-A, B	2037296	09-07-80
		LU-A-	81918	04-06-81
		NL-A-	7908516	28-05-80
		SE-B-	454276	18-04-88
		SE-A-	7909721	16-06-80
		AT-B-	367769	26-07-82
		JP-A-	58192896	10-11-83
		JP-B-	63038330	29-07-88
		JP-C-	1482912	27-02-89
		JP-A-	55094320	17-07-80
		JP-B-	62061040	18-12-87
		JP-A-	63164897	08-07-88
		US-A-	4503035	05-03-85
-----				
WO-A-8300693	03-03-83	AU-A-	8820782	08-03-83
		EP-A-	0085693	17-08-83
-----				
DE-A-3306060	23-08-84	EP-A-	0119476	26-09-84
		JP-A-	59224687	17-12-84
-----				
EP-A-158420	16-10-85	FR-A-	2560212	30-08-85
		US-A-	4973556	27-11-90
-----				

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**